

# **CHARAKTERISIERUNG DES HUMANEN KINOMS IM NIERENZELLKARZINOM**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von **Susanne Freund**

aus **Torgau**

---

1. Referentin oder Referent:	Prof. Dr. Lothar Jänsch
2. Referentin oder Referent:	Prof. Dr. Michael Steinert
eingereicht am:	05.09.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am:	13.12.2011

Druckjahr 2011

## **VORVERÖFFENTLICHUNGEN DER DISSERTATION**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin/den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **TAGUNGSBEITRÄGE**

**S. Freund**, K. Haberecht, J. Wissing, P. Hammerer, A. Jenne, L. Jänsch:

Quantitative proteomics targets the kinome in renal cell carcinoma. (Poster)

3rd Joint Conference of the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM) and the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Hannover (März 2010)

**S. Freund**, K. Haberecht, J. Wissing, P. Hammerer, A. Jenne, L. Jänsch:

Quantitative Kinome Analysis in Renal Cell Carcinoma. (Poster)

Cancer Proteomics, Berlin (Juni 2010)

**S. Freund**, K. Haberecht, J. Wissing, P. Hammerer, A. Jenne, L. Jänsch:

Kinome Analysis in Renal Cell Carcinoma. (Poster)

EACR-21, the 21st Meeting of the European Association for Cancer, Oslo (Juli 2010)

**S. Freund**, T. Johl, K. Haberecht, J. Wissing, F. Klawoon, T. Reinl, P. Hammerer, L.

Jänsch: Kinome profiling in renal cell carcinoma by quantitative proteomics. (Poster + Kurzpräsentation)

26<sup>th</sup> Annual EAU Congress, Wien (März 2011)

**S. Freund**, T. Johl, K. Haberecht, J. Wissing, F. Klawoon, P. Hammerer, T. Reinl,

L. Jänsch: Charakterisierung des humanen Kinoms im Nierenzellkarzinom. (Vortrag)

18. Arbeitstagung, Mikromethoden in der Proteinchemie (Juli 2011)

## **KURZBESCHREIBUNG DER ARBEIT**

### **EINLEITUNG:**

Das Nierenzellkarzinom (RCC) ist mit über 80% die häufigste Krebserkrankung der Niere und repräsentiert 2-3% aller bösartigen Tumoren. In Abhängigkeit von Größe, Lokalisation und Metastasierung des Tumors müssen sich Patienten einer lokalen oder systemischen Behandlung unterziehen. Die Ineffizienz der Chemotherapie und das Wissen um veränderte Signalwege führten im letzten Jahrzehnt zu einem therapeutischen Wandel. Kinaseinhibitoren, wie Sorafenib und Sunitinib, wurden als Medikamente zugelassen und blockieren gezielt Komponenten deregulierter Signalwege, u.a. des VHL- oder mTOR-Signalweges. Hierdurch konnte die Entwicklung, die Versorgung und das Wachstum eines Tumors reduziert und die Lebenserwartung der Patienten signifikant verbessert werden. Als wichtige Komponenten und Schlüsselenzyme der Signalwege beeinflussen Proteinkinasen mittels Phosphorylierungen die Aktivität und die Interaktionseigenschaften ihrer Substrate und somit auch der Kinasen selbst. Über 500 Kinasen bilden das „humane Kinom“ und damit die größte Enzymfamilie, welche durch das humane Genom kodiert wird. Eine umfassende, proteomische Charakterisierung der Veränderungen von Kinasen stellt eine wesentliche Voraussetzung zur Identifizierung der fehlregulierten Signalwege dar und ermöglicht neue Einblick in die Tumorphysiologie.

### **METHODEN UND ERGEBNISSE:**

Mit Hilfe eines experimentellen Arbeitsablaufes sollten Kinasen und Phosphorylierungen erstmalig aus *ex-vivo* Gewebe angereichert und anschließend charakterisiert werden. Eine totale Nephrektomie ermöglichte die Entnahme von erkranktem sowie korrespondierendem gesunden Gewebe eines Patienten für proteomische Untersuchungen. Insgesamt wurden in drei umfassenden Proteomansätzen Gewebeproben von sechs Patienten unterschiedlichen Alters und Geschlechts hinsichtlich der Veränderungen im Kinom analysiert. Wesentliche Voraussetzung für die umfassende Charakterisierung durch massenspektrometrische Methoden war die gezielte Voranreicherung der niedrig-exprimierten Kinasen. Hierzu wurden immobilisierte Kinaseinhibitoren mit ATP-kompetitiven Bindungseigenschaften eingesetzt. Im Gegensatz zu den therapeutischen Medikamenten, die sich sehr spezifisch gegen Kinasen richten, weisen die Inhibitoren dieser Studie, V16743 und Purvalanol B, eine unspezifische, aber selektiv gegen Kinasen gerichtete Bindung auf. Desweiteren fand in dieser Arbeit das Verfahren IMAC („Immobilisierte Metall Affinitätschromatographie“) Verwendung, welches die Isolierung phosphorylierter Peptide aus einem komplexen

Peptidgemisch ermöglichte. Die Effizienz der Anreicherung zeigte sich in der Auswertung dieses Promotionsprojektes. Durchschnittlich konnten einer Proteinkinase im Vergleich zu einer Nicht-Proteinkinase das Dreifache an detektierten Peptiden zugeordnet werden. Insgesamt war es mit affinitätsbasierten Methoden möglich, die Expression von 221 Kinasen im Nierenzellkarzinom nachzuweisen. Zusätzlich waren ungefähr 50% der identifizierten Kinasen mit phosphorylierten Peptiden assoziiert.

Neben der Detektion und Identifizierung von Kinasen und Phosphorylierungen beinhaltet der etablierte Arbeitsablauf eine statistisch abgesicherte, relative Quantifizierung mittels 4plex-iTRAQ, welches auch Patient-zu-Patient Validierungen erlaubte. iTRAQ wird als Markierungstechnologie nach der Proteinextraktion eingesetzt und erschien daher sehr gut für die Analyse von *ex-vivo* Gewebeproben geeignet. Zum einen konnten Einblicke in tumorassoziierte Veränderungen eines Patienten gewonnen werden, zum anderen gestattete der direkte Vergleich von gesunden Geweben unterschiedlicher Patienten wertvolle Eindrücke in die Patientendiversität.

Von allen sechs Patienten konnten Kinase-Regulationsprofile bestimmt werden. Die untersuchten Nierenzellkarzinome deckten dabei verschiedene Stadien der Entwicklung und Ausbreitung des Tumors ab. 33 Kinasen wurden identifiziert, die unabhängig vom Stadium konsistent Veränderungen im Tumor aufwiesen. Zudem waren bei 21 Kinasen Unterschiede im Phosphorylierungsmuster ersichtlich.

### **ZUSAMMENFASSUNG:**

Das Ergebnis dieser Arbeit demonstriert die Anwendbarkeit eines proteomischen Arbeitsablaufes zur Anreicherung und Charakterisierung von Kinasen und Phosphorylierungsereignissen aus *ex-vivo* Nierenparenchym und Tumorgewebe. Neben bereits bekannten Krebs- und RCC-relevanten Veränderungen an Kinasen und deren Phosphorylierungen konnten neue Kandidaten entdeckt und in physiologische Prozesse eingeordnet werden. Die Arbeit bildet daher den Grundstein für weitere Untersuchungen und trägt dazu bei, das Verständnis zum RCC, seiner Entwicklung und der beteiligten Signalwege zu verbessern.

## INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung.....	8
1.1	Krebserkrankungen: Definition und Statistik.....	8
1.2	Nierenzellkarzinom .....	9
1.2.1	Epidemiologie und Ätiologie .....	9
1.2.2	Diagnose .....	9
1.2.3	Klassifizierung .....	9
1.2.4	Lokale und Systemische Therapie .....	11
1.3	Signalwege und Kinasen im Nierenzellkarzinom .....	14
1.3.1	Signaltransduktion .....	14
1.3.2	Kinasen und Phosphorylierung .....	15
1.3.3	Veränderte Kinasen und Signalwege im RCC.....	16
1.4	Signaltransduktionsanalysen mit Methoden der Proteomik.....	20
2.	Zielsetzung.....	25
3.	Material und Methoden.....	26
3.1	Chemikalien, Reagenzien und Puffer.....	26
3.2	Allgemeine Vorschrift zum Ansetzen von Lösungen und Puffer .....	27
3.3	Allgemeine biochemische Methoden .....	27
3.3.1	Protein-Konzentrationsbestimmung mittels BCA .....	27
3.3.2	Eindimensionale SDS-Proteingelelektrophorese .....	27
3.3.3	Proteinfärbungen.....	29
3.3.4	Western Blot und Immunodetektion .....	29
3.3.5	Antikörper- Desorption.....	31
3.4	Gewinnung humaner ex-vivo Gewebeproben.....	32
3.5	Quantitative Phosphokinom-Analyse.....	33
3.5.1	Aufbereitung humaner <i>Ex-vivo</i> Gewebeproben.....	33
3.5.2	Kinase- selektive Affinitäts-Chromatographie .....	35
3.5.3	Proteinaufreinigung.....	37
3.5.4	iTRAQ-Markierung .....	38
3.5.5	Peptidaufreinigung.....	38
3.5.6	IMAC zur Aufreinigung phosphorylierter Peptide .....	40
3.5.7	Kationenaustausch-Chromatographie .....	40
3.5.8	Peptid- Trennung und- FrAGMENTIERUNG.....	41
3.5.9	Peptid-/ Protein- Identifizierung .....	42
3.5.10	Regulationsanalyse .....	43
3.6	Verwendete Software .....	44

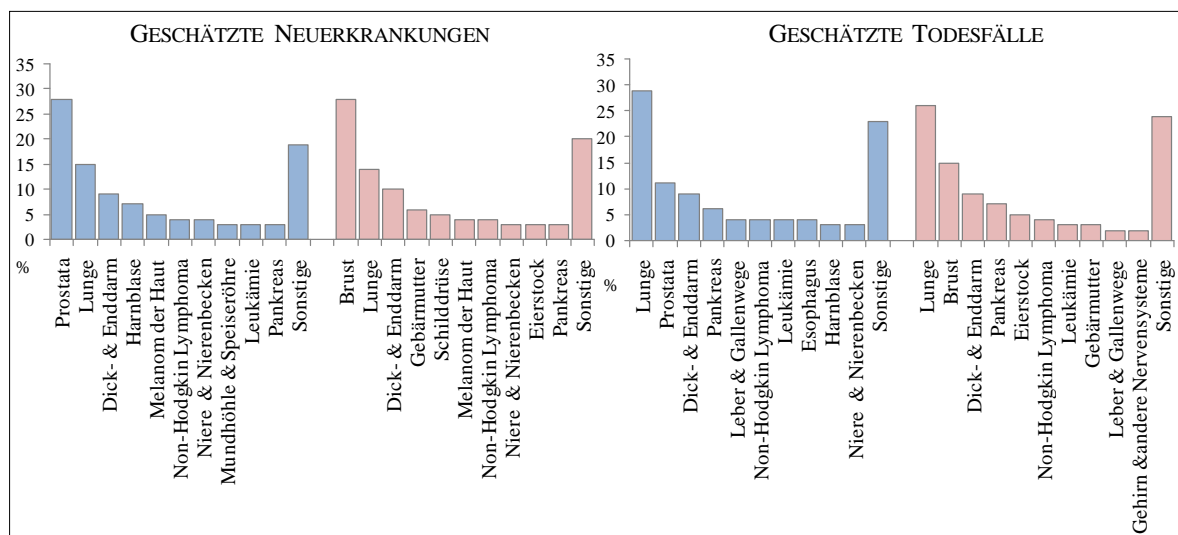


# 1. EINLEITUNG

## 1.1 KREBSERKRANKUNGEN: DEFINITION UND STATISTIK

Krebserkrankungen können durch eine Reihe somatischer Mutationen des Erbgutes körpereigener Zellen ausgelöst werden [1,2]. Die resultierenden Defekte in den regulatorischen Schaltkreisen führen u.a. zu unkontrolliertem Zellwachstum. Hanahan und Weinberg (2000) [3] beschrieben sechs Schlüsselmerkmale der Zellphysiologie, die zusammen betrachtet malignes Wachstum definieren: Unabhängigkeit bezüglich der Wachstumssignale, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumsinhibierenden Signalen, Umgehung des programmierten Zelltodes (Apoptose), unbegrenztes Teilungsvermögen, dauerhafte Angiogenese sowie Invasion und Metastasierung.

Jedem vierten Todesfall liegt eine Krebserkrankung zugrunde. Damit zählt die Entwicklung von Tumoren neben den Erkrankungen des Herzes sowohl in den Vereinigten Staaten als auch in Europa zu den häufigsten Todesursachen. Die entarteten Zellen können dabei ihren Ursprung in unterschiedlichen Geweben haben. Während Brust- und Prostatakrebs die schätzungsweise meisten Neuerkrankungen darstellen, ist der Lungenkrebs mit einem Anteil von über 26% die häufigste Krebstodesursache (Abb. 1-1) [4].



**Abb. 1-1: Krebsneuerkrankungen und Todesfälle.** US-Statistik für das Jahr 2010, nach geschlechtsspezifischer Verteilung (männlich: hellblau, weiblich: rosa) [4]. Prostata- und Brustkrebs sind mit jeweils über 20% die häufigsten Krebserkrankungen und stellen 11% bzw. 15% der Krebssterbefälle dar. Die meisten Krebstodesfälle gehen jedoch mit über 25% auf Lungenkrebs zurück.



## **1.2 NIERENZELLKARZINOM**

### **1.2.1 EPIDEMIOLOGIE UND ÄTIOLOGIE**

Das Nierenzellkarzinom („Renal cell carcinoma“, RCC), mit Ursprung im Nierenparenchym, ist die häufigste neoplastische Erkrankung der Niere im Erwachsenenalter und repräsentiert 2 – 3% aller bösartigen Tumoren. Weltweit und in Europa (Ausnahme: Schweden und Dänemark) wurde eine Erhöhung der Inzidenz (Anzahl der Neuerkrankungen) um ungefähr 2% jährlich registriert [5,6]. Mit einem Verhältnis von 1.5:1 überwiegt dieser epitheliale Tumor bei Männern im Vergleich zu Frauen. Der Peak der Inzidenz liegt zwischen 60 und 70 Jahren, wobei Übergewicht [7] und der Genuss von Zigaretten [8] als ätiologische Faktoren ins Gewicht fallen.

### **1.2.2 DIAGNOSE**

Klassische Beschwerden wie Flankenschmerzen, Blut im Urin oder eine unnormale abdominale Masse treten bei der Diagnose eher in den Hintergrund (5% – 10%) [9]. Vielmehr führt die steigende Nutzung abdominaler Aufnahmesysteme (CT, MR und Sonographie) zu einer verbesserten Diagnose asymptomatisch gekennzeichnete Tumoren. Dabei handelt es sich vor allem um kleinere Tumoren, die niedrigeren Stadien zugeordnet werden [10], während symptomatische Erkrankungen bei Patienten eher den höheren Stadien angehören und oftmals mit Metastasen assoziiert sind.

### **1.2.3 KLASSIFIZIERUNG**

#### **Anatomische Faktoren**

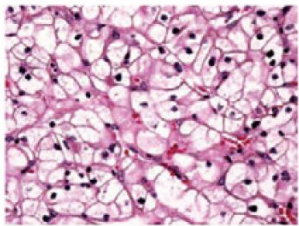
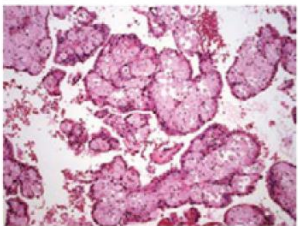
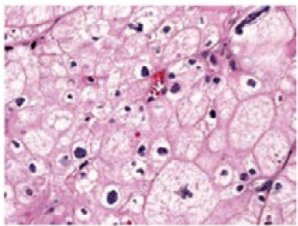
Ein wichtiges prognostisches Kriterium ist die Eingruppierung in verschiedene Stadien, basierend auf der TNM-Klassifizierung [11,12] (Tab. 1-1). Der Buchstabe T kennzeichnet die Einordnung der Tumorgroße und der Streuung ins umliegende Nierengewebe. Unter N werden Informationen zu befallenen Lymphknoten und deren Anzahl zusammengefasst. Eine Metastasierung in andere, entfernte Organe wird durch M1 gekennzeichnet.

**Tab. 1-1: Eingruppierung der Stadien mittels TNM-Klassifikation**

Stadium	Primärer Tumor	Regionale Lymphknoten	Fernmetastasen
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
Stadium IV	T1, T2, T3	N1	M0
	T4	N0, N1	M0
	Jedes T	N2	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

### Histologische Faktoren

Ein weiterer, wichtiger prognostischer Faktor für die Einteilung des Tumorgewebes ist der histopathologische Grad [13]. Bei dem Fuhrmann-Grading wird anhand der Ähnlichkeit des Tumorgewebes zum Ursprungsgewebe ein Differenzierungsgrad (G1 – G4) angegeben. Ein niedriger Tumorgrad bedeutet eine geringe Differenzierung. G4 hingegen unterscheidet sich stark vom ausgehenden Gewebe und zieht eine schlechte Prognose mit sich. Basierend auf der Klassifizierung der ‚World Health Organization‘ (WHO) [14] existieren histologisch betrachtet drei Haupt-Untertypen des Nierenzellkarzinoms: das klarzellige (konventionelle), das papillare und das chromophobe RCC (Abb. 1-2). Über 80% der diagnostizierten Tumoren werden dem klarzelligen Karzinomtyp zugeordnet.

	Klarzellig (ccRCC)	Papillar	Chromophob (chrRCC)
Histologie			
Häufigkeit	70% – 80%	10% – 15%	3% – 5%
Genetische Veränderungen	Deletion des Chromosom 3p Segments Inaktivierung vom VHL Gen durch Mutation und Hypermethylierung des Promotors Lücke im Chromosom 5q Verlust des Chromosoms 8p, 9p und 14q	Trisomie des Chromosoms 7 und 17 Verlust des Chromosoms Y bei Männern Lücke im Chromosom 12, 16 und 20 Seltene Mutation des Proto-Onkogen Met	Verlust des Chromosoms Y, 1, 2, 6, 10, 13, 17 und 21

**Abb. 1-2: Die häufigsten histologisch differenzierten Nierenzellkarzinomtypen.** Neben der Histologie wurden die Häufigkeit und bekannte genetische Veränderungen vermerkt [200].

#### 1.2.4 LOKALE UND SYSTEMISCHE THERAPIE

Für die Behandlung des Nierenzellkarzinoms wurden in den letzten Jahren neue innovative Strategien entwickelt, die dazu beigetragen haben, sowohl die chirurgischen als auch die therapeutischen Verfahren und die damit verbundenen Heilungschancen zu verbessern. Dabei werden zwischen lokalen und systemischen Therapieansätzen unterschieden.

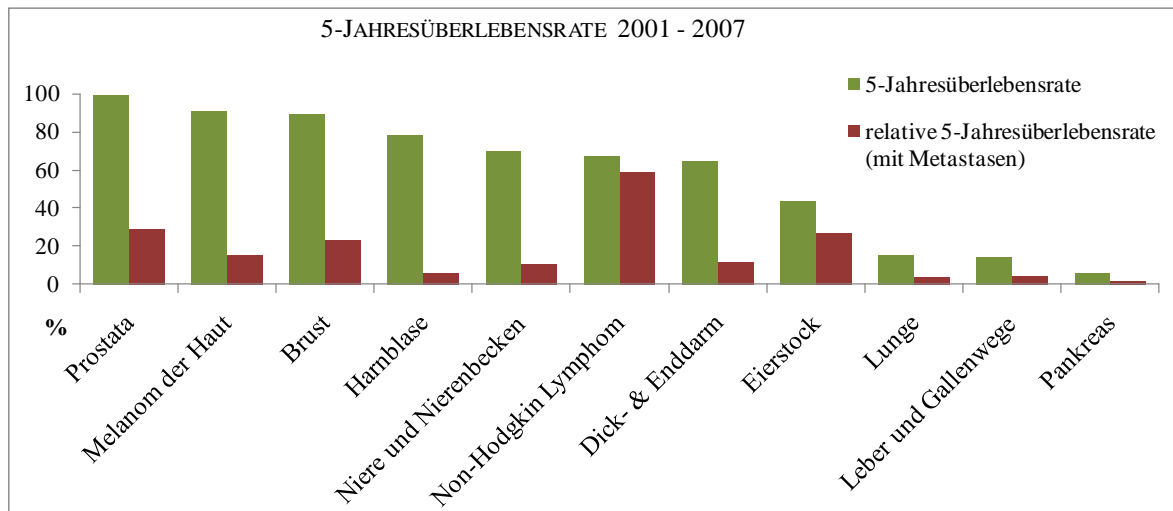
Lokale Formen des Nierenzellkarzinom werden in Abhängigkeit der Tumorgröße und Lokalisation partiell oder total operativ entfernt (Nephrektomie). Bei Patienten, deren Tumor bereits Metastasen gebildet hat, ist eine systematische Behandlung notwendig. Dieser Therapieansatz betrifft den gesamten Organismus, da sich die Medikamente über den Blutkreislauf verteilen. Metastasen können dadurch effizienter behandelt werden. Eine Nephrektomie kann zusätzlich die mediane Überlebensdauer einer nachfolgenden Interferon-Immuntherapie um bis zu 50% verbessern [15].

#### **Chemotherapie**

Die Chemotherapie gehört zu der klassischen Therapie gegen viele Krebserkrankungen. Mit der medikamentösen Gabe von Zytostatika werden vor allem bei Krebszellen die Teilung und das Wachstum gehemmt.

Aufgrund der Überexpression des p-Glycoproteins (p-GP) ist das Nierenzellkarzinom jedoch gegen diese Form der Behandlung resistent [16]. P-GP ist ein membranständiger ABC-Transporter und normalerweise in Organen präsent, die kleine Moleküle absorbieren (Dick- und Dünndarm), verteilen (zentrales Nervensystem) oder eliminieren (Leber, proximaler Tubulus der Niere) [17]. Da das Nierenzellkarzinom seinen Ursprung in p-GP-exprimierenden Zellen hat, wird bei entsprechenden therapeutischen Behandlungen die intrazelluläre Konzentration des chemotherapeutischen Medikamentes in den Krebszellen durch die Aktivität des überexprimierten p-Glycoproteins reduziert. Dadurch kann sich eine Multidrug-Resistenz des Nierenzellkarzinoms aufbauen [18].

Die Konsequenzen dieses Phänomens zeigen sich deutlich bei der Betrachtung der 5-Jahresüberlebensrate (Abb. 1-3), die bei metastasierten Tumoren auf 11% sinkt [19]. Daher war es in den letzten Jahren umso wichtiger, alternative therapeutische Ansätze zu entwickeln. Neben der Zytokin-Therapie wurde entsprechend auch die Forschung an Kinaseinhibitoren vorangetrieben.



**Abb. 1-3: 5-Jahresüberlebensrate bei Krebserkrankungen.** Das Diagramm zeigt für elf Krebserkrankungen in grün die 5-Jahresüberlebensrate über alle Erkrankungsstadien an und in rot die Überlebensrate bei Patienten mit metastasierten Tumoren. [<http://seer.cancer.gov/statfacts/index.html>]

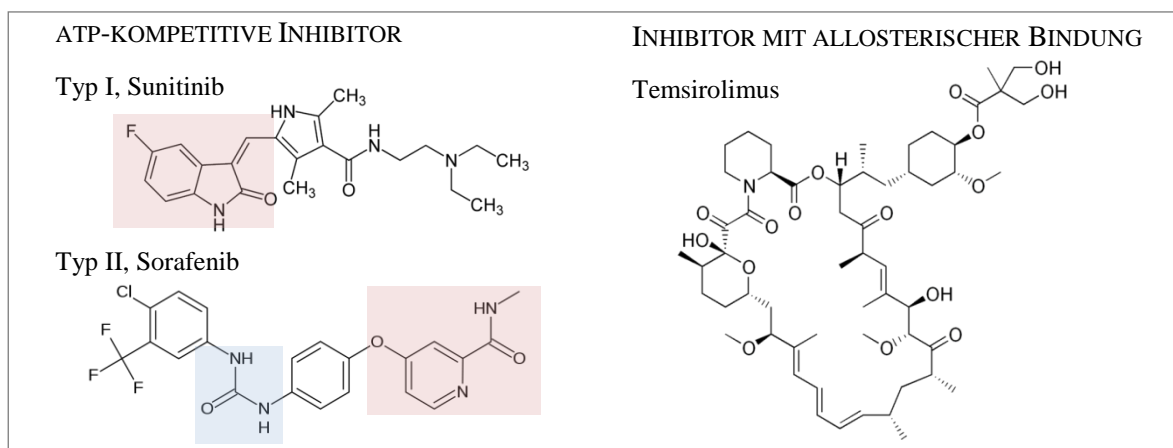
### Kinaseinhibitoren und Antikörper

Die Ineffizienz der Chemotherapie und die geringe Ansprechrates (15%) bei einer systemischen Zytokin-Therapie mit Interleukin 2 oder Interferon- $\alpha$  führten zur Umstrukturierung des klinischen Managements vom RCC [20]. Durch das zunehmende Verständnis veränderter Signalwege und involvierter Proteinkinasen gewannen speziell Kinaseinhibitoren als neue, zielgerichtete Wirkstoffe an Bedeutung [21]. Für die effiziente Blockierung von Kinasen stehen verschiedene therapeutisch wirksame Strategien zur Verfügung [20,22]. Neben monoklonalen Antikörpern, wie Bevacizumab, die sich speziell gegen die extrazelluläre Ligandenbindestelle von Rezeptor-Tyrosinkinasen richten [23], werden in aktuellen Therapien niedermolekulare Proteinkinase-Inhibitoren eingesetzt. Laut der EAU Guideline 2009 wurden zusammen mit Bevacizumab (Avastin®) und Temsirolimus (Torisel®) insgesamt vier Angiogenese-Inhibitoren zur Behandlung von metastasierten oder fortgeschrittenen RCC in den USA und Europa zugelassen [6]. Die ersten Zulassungen wurden für die Tyrosin-Kinaseinhibitoren Sorafenib (Nexavar®, Bayer Schering Pharma AG) und Sunitinib (Sutent®, Pfizer) im Jahr 2006 [25,26] erteilt: Sorafenib verlängert signifikant das progressionsfreie Überleben der Patienten als Zweitlinientherapie; Sunitinib wurde als Erstbehandlung mit Interferon- $\alpha$  verglichen und zeigt neben einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens um 6 Monate eine höhere objektive Ansprechrates [26,27]. Aufbauend auf diesen ersten Erfolgen wurden in den letzten Jahren weitere Inhibitoren entwickelt, wovon sich heute einige in klinischen Studien befinden oder bereits zugelassen sind, z.B. (Pazopanib (Votrient®), 2010, [28]; Everolimus (Afinitor®), 2009 [29]).

## MECHANISMEN DER BLOCKIERUNG VON PROTEINKINASEN

Klinisch-relevante Inhibitoren sollen die ATP- und/oder Substratbindung verhindern und somit die Kinaseaktivität inhibieren. Für eine effiziente Bindung des Inhibitors müssen die Voraussetzungen einer spezifischen und hochaffinen Bindung an die Kinase erfüllt sein [30]. Nur so kann gewährleistet werden, dass sich Nebeneffekte durch weitere Bindungspartner und Ineffizienz durch die konkurrierende, in der Zelle vorherrschende, hohe intrazelluläre ATP Konzentration minimieren. Dabei werden unterschiedliche Bindungstypen unterteilt (Abb. 1-4). Die ATP-kompetitiven Inhibitoren vom Typ I können ausschließlich an der katalytischen Domäne innerhalb der ATP-Bindestelle selbst binden (z.B. Sunitinib), wohingegen Inhibitoren vom Typ II eine zusätzliche Bindungsregion in direkter Umgebung der ATP-Bindungsstelle besitzen (z.B. Sorafenib) [31]. Trotz des dualen Bindungsmechanismus beim Typ II zählen ATP-kompetitive Inhibitoren generell zu den Multi-Kinaseinhibitoren, da sie auf Grund der starken Sequenzähnlichkeit der katalytischen Domänen verwandter Proteine meist mehrere Bindungspartner aufweisen. Bislang ist kein Inhibitor beschrieben, der eine einzelne Kinase als Bindungspartner aufweist und gezielt inhibiert.

Temsirolimus gehört zu den allosterischen Inhibitoren, die außerhalb der Kinasedomäne binden und auf diese Weise die Kinaseaktivität minimieren [32]. Die Wirkung ist im Vergleich zu den ATP-kompetitiven Inhibitoren weniger effektiv, aber dafür sehr selektiv, da die Bindung an den nicht-konservierten Bereichen der Proteinoberfläche stattfindet.

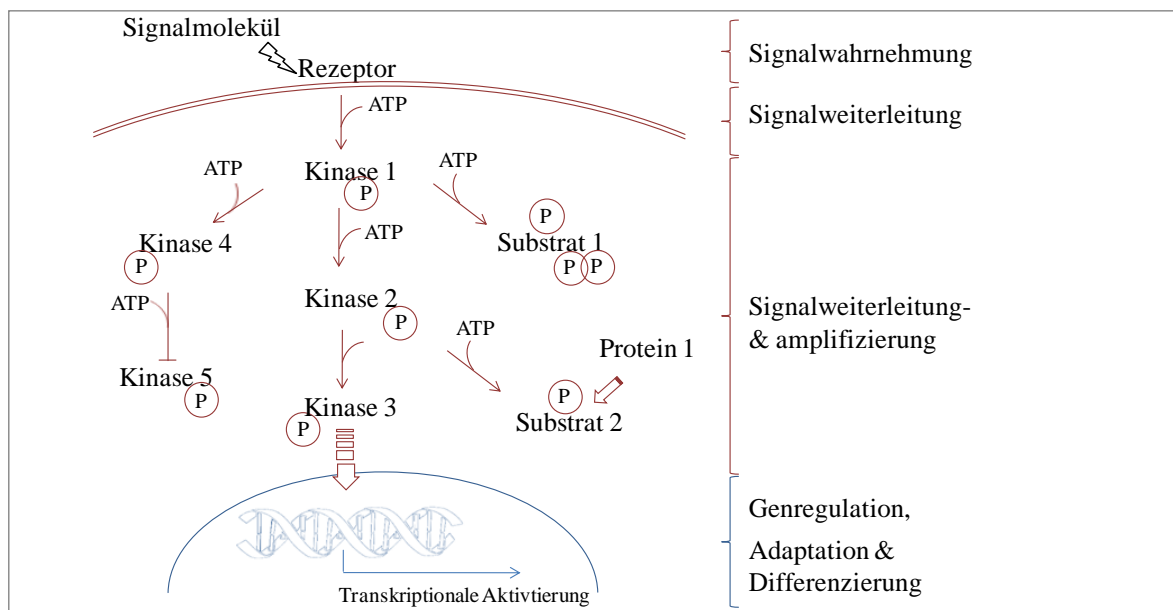


**Abb. 1-4: Mechanismen der Bindung klinisch-relevanter Kinaseinhibitoren.** Sorafenib, Sunitinib und Temsirolimus gehören zu den nieder-molekularen Kinaseinhibitoren, weisen aber unterschiedliche Bindungsmechanismen auf. ATP-kompetitive Inhibitoren vom Typ-I und -II binden innerhalb der Region, welche ansonsten durch den Adenin-Ring des ATP besetzt wird (rosa). Typ-II-Inhibitoren binden zusätzlich an einem hydrophoben Bereich (blau). Temsirolimus inhibiert Kinasen durch eine Bindung außerhalb ihrer Kinasedomäne.

### 1.3 SIGNALWEGE UND KINASEN IM NIERENZELLKARZINOM

#### 1.3.1 SIGNALTRANSDUKTION

Bei der Signaltransduktion werden Signale und Reize aus der Umwelt aufgenommen, verarbeitet und zur Steuerung zellulärer Prozesse ins Zellinnere weitergeleitet. Die durch die Signaltransduktion ausgelösten molekularen Reaktionen finden innerhalb von Minuten statt. Damit kann unmittelbar die Aktivität zellulärer Prozesse beeinflusst werden oder eine Umstrukturierung der Genregulation stattfinden, die es einer Zelle erlaubt, langfristig auf das Signal zu reagieren und zu adaptieren. Die Wahrnehmung der Stimuli, meist Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Hormone, erfolgt u.a. über membranständige Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK). Die Bindung der Liganden an die extrazelluläre Domäne der RTK führt zu einer Dimerisierung des Rezeptors, gefolgt von einer Autophosphorylierung und einer damit einhergehenden Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne [33]. Anschließend wird eine Signalkaskade durch die Rekrutierung und Aktivierung nachfolgender Signalmoleküle gestartet. Diese Signalmoleküle steuern durch post-translationale Modifikationen wie Glykosylierung, Ubiquitinierung oder Phosphorylierung die Weitergabe des Signals [34]. Kinasen stellen Schlüsselenzyme der Signaltransduktion dar, da sie durch Phosphorylierung die Lokalisation, die Aktivität sowie die Interaktions-



**Abb. 1-5: Signaltransduktion mit Fokus auf Phosphorylierungen.** Ein extrazelluläres Signal wird von einem membranständigen Rezeptor aufgenommen und mittels Kinasen als Signalverstärker weitergeleitet. Phosphorylierungen (P) können die Aktivität des Substratproteins (Kinase 2: aktiv, Kinase 5: gehemmt), die Lokalisation (Kinase 3: Verlagerung in den Kern) oder die Interaktionspartner (Substrat 2-Protein 1) ändern.

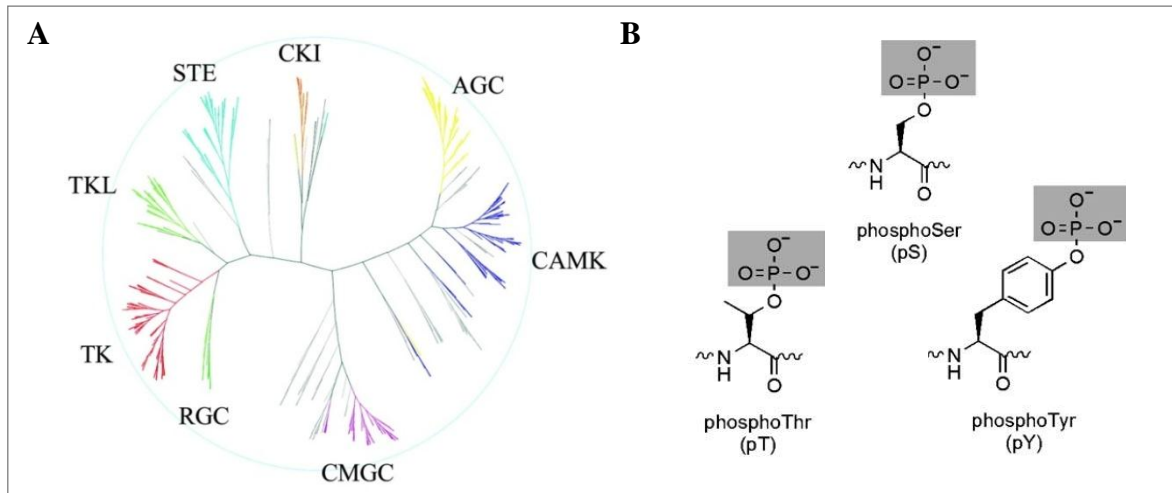
partner eines Substrates regulieren können (Abb. 1-5).

### 1.3.2 KINASEN UND PHOSPHORYLIERUNG

Durch ihre essentielle Funktion in der Signaltransduktion sind Proteinkinasen an der Kontrolle vieler wichtiger zellulärer Prozesse, wie der Proliferation, dem Zytoskeletumbau oder der Angiogenese, involviert. Diese Vielseitigkeit und die gravierenden Auswirkungen bei einer Fehlregulation können zur Entstehung und Resistenzentwicklung von Krebszellen beitragen [35]. Dadurch werden die Mitglieder dieser Proteinfamilie zu attraktiven Forschungsobjekten und zu Zielen möglicher therapeutischer Ansätze [21].

Insgesamt wurden 518 putative Kinasen durch Manning et al. [36] unter dem Begriff ‚humanes Kinom‘ zusammengefasst. Darunter waren auch 40 atypische Kinasen, die keine funktionelle Kinasedomäne aber dafür andere biologische Aktivitäten aufweisen. Die Einteilung der restlichen 478 humanen Proteinkinasen in acht Gruppen (Abb. 1-6 A) und 134 Familien erfolgte primär anhand des Sequenzvergleichs der katalytischen Domäne und der Zuordnung bekannter biologischer Funktionen.

Die Signalübertragung der Kinasen wird über reversible Phosphorylierungen der Substratproteine im Zusammenspiel mit Phosphatasen reguliert und in Balance gehalten. Bei dieser posttranslationalen Modifikation (PTM) wird durch eine Kinase eine endständige Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) kovalent auf die Aminosäuren Threonin (Thr), Serin (Ser) und Tyrosin (Tyr) des Substratproteins übertragen (Abb. 1-6 B). Eine weitere Klassifizierung kann daher anhand dieser Akzeptor-Aminosäure in Ser/Thr- und Tyr-Kinasen erfolgen. Phosphorylierungen an Serin und Threonin sind verbreiteter, was sich durch ein Phosphorylierungsverhältnis (pSer:pThr:pTyr) an Substratproteinen von 1800:200:1 widerspiegelt [37,38]. pSer und pThr sind an der Regulation von Protein-Protein Interaktionen und der Steuerung zellulärer Prozesse beteiligt, z.B. durch die Bindung mit 14-3-3 Proteinen, WW-, WD40 und FHA Domänen oder Leucin-reichen Regionen [39]. Phosphorylierte Tyrosine aktivierter RTKs gehen mit der Rekrutierung zytoplasmatischer Proteine einher, die durch SH2 oder PTB Domänen gekennzeichnet sind. Damit sind Tyrosin-Phosphorylierungen an intrazellulären Signalwegen involviert [40].



**Abb. 1-6: Das humane Kinom und Phosphorylierungen.** (A) Abbildung des humanen Kinoms nach Manning et al. [36], wobei hier die Einteilung in die acht Gruppen deutlich wird (TK: Tyrosin-Kinasen; TKL: Tyrosin-Kinase-ähnliche; STE: STE-Kinase-Familie; CKI: Casein-Kinase1-Gruppe; AGC: PKA/PKG/PKC-Kinasen; CAMK: Cam-Kinase-Familie; CMGC: CDK/MAPK/GSK3/CLK-Kinasen). (B) Phosphorylierungen an Aminosäureketten bei Proteinen: an Serin, Threonin und Tyrosin [34]

### 1.3.3 VERÄNDERTE KINASEN UND SIGNALWEGE IM RCC

#### VHL-Signalweg

Neben erblichen Nierenkrebserkrankungen sind mehr als 60% der sporadisch auftretenden klarzelligen Nierenzellkarzinome mit einer Mutation im VHL Gen auf dem Chromosom 3p assoziiert [41-43].

In einer gesunden Zelle bildet das VHL-Tumorsuppressorprotein (pVHL) zusammen mit Elongin B (EloB), Elongin C (EloC) und Culicinin (Cul2) einen Proteinkomplex, der als E3-Ubiquitin-Ligase agieren kann. Unter normalen, sauerstoffhaltigen Bedingungen werden die HIF- $\alpha$ -Untereinheiten („Hypoxia-inducible factor“) durch die Prolyl-4-Hydroxylase (PHD) hydroxyliert und können von dem VHL-Komplex gebunden und ubiquitiniert werden. Durch diese Modifikation werden die HIF- $\alpha$ -Untereinheiten einer Proteasom-vermittelten Degradation zugeführt. Sauerstoffmangel hingegen verhindert die Hydroxylierung und führt zu einer Stabilisierung von HIF- $\alpha$  und der Translokation in den Kern, wo es mit der konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit zu dem aktiven Transkriptionsfaktor HIF dimerisiert. HIF dient als Regulator der Sauerstoffversorgung und des Stoffwechsels, indem er die Expression von mehr als 100 Zielgenen, darunter Angiogenese-fördernde Faktoren, wie VEGF, PDGF oder Bestandteile des glykolytischen Stoffwechsels steuert (Abb. 1-7).



Durch die VHL-Inaktivierung im Nierenzellkrebs wird ein Sauerstoffmangel simuliert und die Proliferation, Glukoseaufnahme, Angiogenese und Vaskulogenese aktiviert. Diese zellulären Prozesse fördern durch eine bessere Durchblutung und Nährstoffversorgung das Tumorwachstum. [44-47]

### **Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg**

Der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg ist an der Regulation von Proteinen beteiligt, die Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose beeinflussen können. Eine veränderte Aktivierung und Expression der beteiligten Komponenten wurde bereits in vielen Krebserkrankungen diagnostiziert und diente zur Entwicklung verschiedener Therapien [48-50].

Die Bindung von Wachstumsfaktoren oder Zytokinen an RTKs (z.B. c-MET, EGF) induziert den Austausch des Guanosindiphosphates (GDP) gegen Guanosin triphosphat (GTP) bei der Ras-Kinase. Das aktive GTP-gebundene Ras führt durch die Rekrutierung von Raf (MEKKK) zur Zellmembran zu dessen Aktivierung. Innerhalb der MAPK-Kaskade kann die aktive Proteinkinase Raf MEK (MAPKK) phosphorylieren, welches wiederum ERK (MAPK) durch Phosphorylierung aktiviert (Abb. 1-7). ERK-Substratproteine, wie die Ribosomale S6 Kinase, und Transkriptionsfaktoren, wie Fos, c-Jun und c-Myc, führen zu Veränderungen der Genexpression, welche die zellulären Prozesse der Zellteilung, Differenzierung und Überleben beeinflussen können. [50-52]

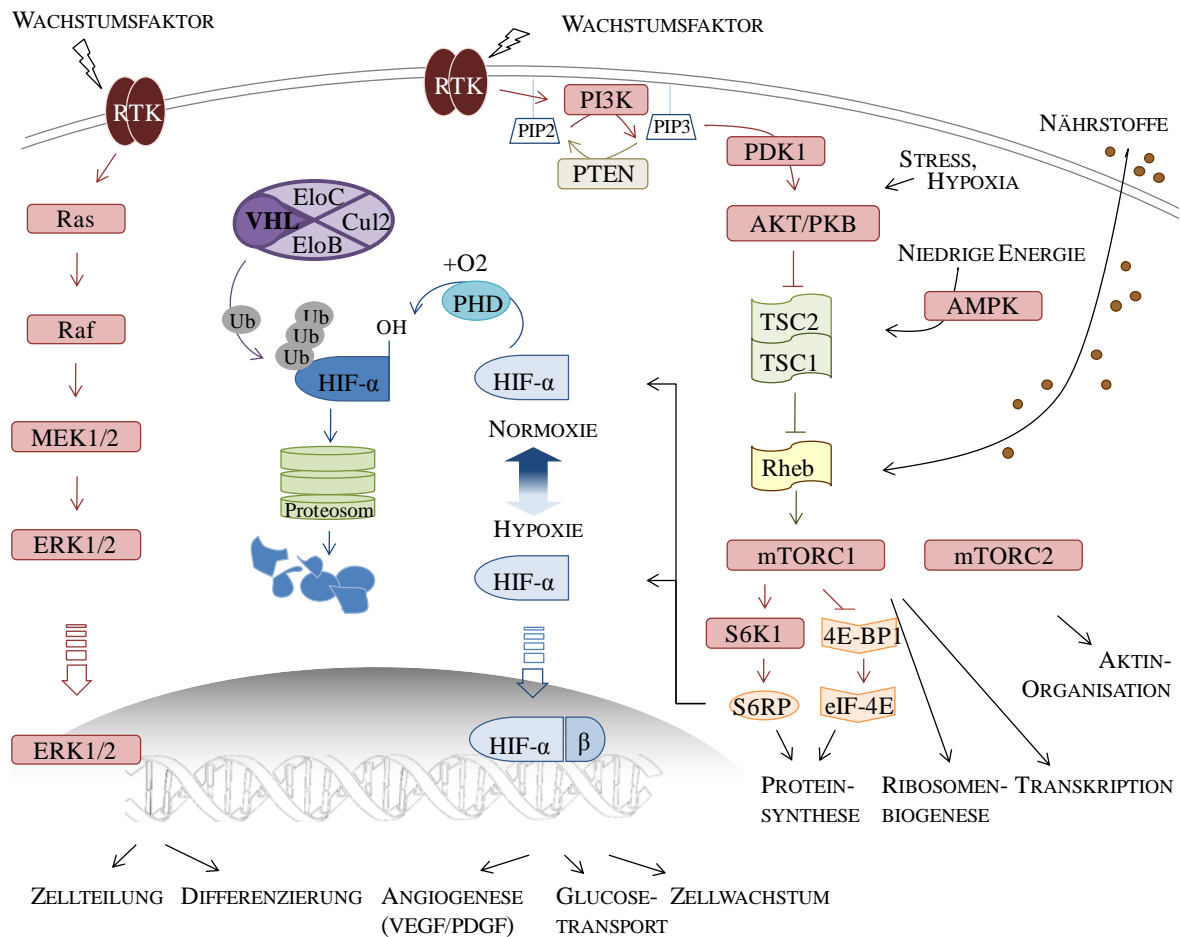
Im Nierenzellkarzinom wurden bereits 1995 Veränderungen in der Aktivität der beteiligten Komponenten, speziell der MAP Kinase, beschrieben [53]. Immunhistochemische Analysen der phosphorylierten ERK1/2 bestätigten deren Aktivierung im ccRCC [54].

### **mTOR-Signalweg**

Der mTOR-Signalweg (mTOR ‚mammalian target of rapamycin‘) (Abb. 1-7) reflektiert die Nährstoffverfügbarkeit, den Energiestatus, den vorhandenen Stress und den Einfluss von Wachstumsfaktoren einer Zelle. Bei einer Fehlregulation führen die initiierten Prozesse zu Tumorwachstum. Beim mTOR-Signalweg spielen zwei Multiproteinkomplexe eine Rolle: TOR-Komplex 1 (mTORC1) und TOR-Komplex 2 (mTORC2). mTORC1 reguliert zum einen über 4E-BP1 den Translations-Initiationsfaktor eIF-4E und steuert zum anderen die Phosphorylierung des Ribosomalen S6 Proteins (S6RP) durch die Ribosomale S6 Kinase (S6K1). Die damit vermittelte Translation von Tumor-unterstützenden Proteinen, z.B. HIF- $\alpha$ , VEGF, c-Myc, fördern das Zellwachstum, den Stoffwechsel, die

Zellteilung und die Angiogenese. mTORC2 ist an der Organisation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt und beeinflusst die Zelladhäsion und Migration. [55,56]

Der vor den mTOR-Komplexen geschaltete Signalweg wird durch extrazelluläre Signale beeinflusst. Die Stimulation der RTKs mit Wachstumsfaktoren (IGF, Insulin, HGF, VEGF und PDGF) aktiviert PI3K, was über Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP<sub>3</sub>) zur Rekrutierung der Kinase AKT an die Zellmembran, deren Phosphorylierung und Aktivierung beiträgt. Die Verbindung des PI3K/AKT-Signalweges zu mTOR erfolgt über TSC1 und TSC2 („Tuberous sclerosis protein“). Dieses Heterodimer hemmt bei Nährstoffmangel und niedrigem Energiestatus mTOR. AKT wiederum kann TSC2 phosphorylieren und funktionell inaktivieren [55,57,58].



**Abb. 1-7: Bekannte im RCC-involvierte Signalwege.** Ras/Raf/MEK/ERK, VHL und PIK3/AKT/mTOR (von links nach rechts) sind drei in der Entwicklung, Versorgung und Wachstum eines Tumors beteiligte Signalwege. Dabei tragen neben Wachstumsfaktoren, die Nährstoff- und Sauerstoffverfügbarkeit zu wichtigen zellulären Umstrukturierungen bei. Sauerstoff kann z.B. zur Hydroxylierung von HIF-α, der anschließenden Ubiquitinierung durch den VHL-Komplex und zur damit verbundenen Degradation führen. Im RCC kann eine Mutation im VHL-Proteinkomplex, den Abbau von HIF-α negativ beeinflussen und die Transkription und Translation Tumor-unterstützender Proteine auslösen.

Eine Deregulierung der beteiligten Komponenten, z.B. der Verlust des Tumorsuppressorproteins PTEN [59] oder eine verstärkte Aktivität der katalytischen Untereinheit von PI3K, kann ebenfalls zur Entwicklung und zum Wachstum von Nierenzellkarzinomen beitragen [58].

### **Veränderte Signalwege als therapeutischer Angriffspunkt**

In ihrer Fehlregulation können alle genannten Signalwege zur Entwicklung des Nierenzellkarzinoms beitragen. Daher sind die bereits zugelassenen Wirkstoffe gegen Komponenten dieser Signalwege gerichtet und zielen insbesondere auf eine Inhibierung der Angiogenese ab. Einer der ersten zugelassenen mTOR-Inhibitoren war das Rapamycin-Analogon Temsirolimus. Da mTORC2 Rapamycin-resistent ist, inhibiert Temsirolimus vermutlich nur die Aktivität von mTORC1[58].

Um den Prozess der Angiogenese zu blockieren und durch die fehlende Nährstoffversorgung das Tumorstadium zu hemmen, wurden zudem Bevacizumab, Sorafenib und Sunitinib für die Behandlung des Nierenzellkarzinoms zugelassen. Bevacizumab bindet in Form eines monoklonalen Antikörpers an VEGF und verhindert die Stimulation des VEGF-Rezeptors. Die Tyrosin-Kinaseinhibitoren Sorafenib und Sunitinib unterbinden durch Blockierung der jeweiligen Rezeptoren (Sorafenib: VEGFR-1,-2 und -3, PDGFR; Sunitinib: VEGFR-1 und -2, PDGFR) eine Interaktion mit den Wachstumsfaktoren [60]. Bei beiden Medikamenten handelt es sich um Multi-Kinaseinhibitoren. Sorafenib kann zusätzlich durch die Bindung an c-Raf den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg beeinflussen. [61]

Die Signalwege, ihre Komponenten und ihre Verknüpfungen sind weitaus komplexer als bislang erforscht. Von den über 500 bekannten Kinasen sind erst wenige im Zusammenhang mit dem RCC beschrieben worden. Hier können Signaltransduktionsstudien durch Methoden der Proteomik beitragen weitere Komponenten zu identifizieren und diese im Kontext mit dem RCC näher zu charakterisieren.

#### 1.4 SIGNALTRANSDUKTIONSANALYSEN MIT METHODEN DER PROTEOMIK

Genomforschung und die damit verbundenen Hochdurchsatz-Verfahren dominierten in den beiden letzten Jahrzehnten die Untersuchungen von Krebserkrankungen. Diese Methoden ermöglichten dahingehend bereits umfassende Einblicke in somatische Mutationen des humanen Genoms [1,63]. Wegen ihrer zentralen Rolle in der Signaltransduktion sind Proteinkinasen von großem Interesse in der Krebsforschung. Für die Untersuchungen ihrer Expression wurden in der Regel die korrespondierenden mRNA-Mengen gemessen (z.B. mittels cDNA- Microarray) [64,65]. Um jedoch unmittelbaren Einblick in die tatsächlichen Proteinmengen bzw. deren Modifikationen, die Aktivität und die Fehlregulation zellulärer Prozesse und Signalwege zu erhalten, müssen Methoden und Techniken der Proteom- und Phosphoproteomforschung angewendet werden. Gerade im Hinblick auf die Phosphorylierungen und ihren Einfluss auf Aktivität, Lokalisation oder die Interaktionen von Signalkomponenten wuchs das Interesse an technologischen und methodischen Verbesserungen.

Ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese (1D/2D-GE) in Kombination mit Proteinsequenzierung bildete bislang die Standardmethode der vergleichenden Proteomik. Die methodischen Limitierungen (Kapazität, Trennraum, dynamischer Bereich und Sensitivität der Färbetechnik) erschweren jedoch die gelbasierte Analytik bei niedrig-exprimierten Signalmolekülen, zu denen auch die Enzymfamilie der Proteinkinasen gehört. Zwar ermöglicht der Einsatz von  $^{32}\text{P}$ -Markierungen, ProQ-Diamond-Färbungen oder Western Blot-Analysen den Nachweis phosphorylierter Proteine, eine eindeutige Identifizierung des zugehörigen Proteins und die Bestimmung der genauen Position von post-translationalen Modifikation ist jedoch meist nicht möglich [65].

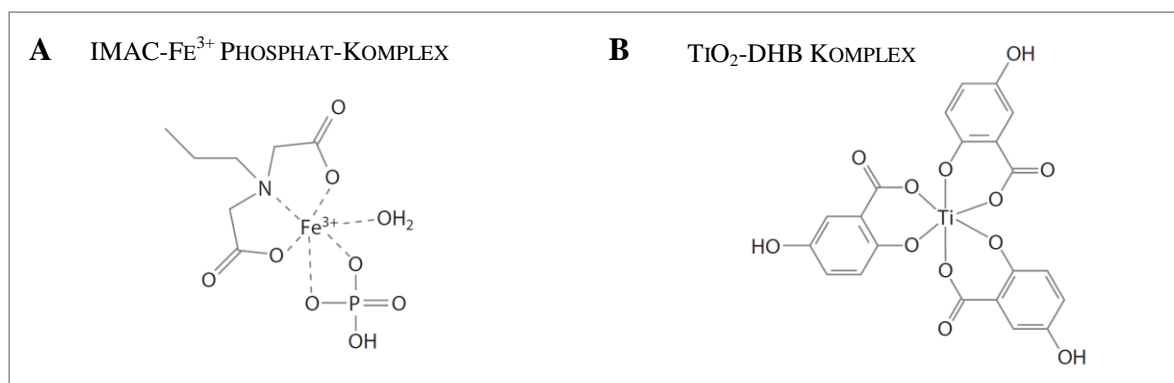
Dies änderte sich mit der gesteigerten Sensitivität, Auflösung und Schnelligkeit der heutigen Massenspektrometrie (MS). Heutzutage ist es durch die Kombination gelfreier Analytik und Peptidsequenzierung möglich, in einem Experiment tausende Proteine eindeutig zu identifizieren. Die Grundlage der meisten MS-basierten proteomischen Analysen bilden der enzymatische Verdau der Proteine, die Auftrennung des Peptidgemisches mittels Flüssigkeitschromatographie und die massenspektrometrische Vermessung, basierend auf Elektrospray-Ionisation und einer nachfolgenden Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS).

Diese Methodik in Kombination mit anderen Technologien wurde bereits für die Detektion, Identifizierung und Quantifizierung von Phosphorylierungen und kinase-vermittelter Signaltransduktion verwendet [38,66,67].

### Anreicherungsstrategien für phosphorylierte Peptide

Verschiedene Strategien verbessern die Detektion von Phosphorylierungen durch die Möglichkeit zur Anreicherung phosphorylierter Proteine bzw. Peptide. Dadurch kann die Stöchiometrie der phosphorylierten Peptide in Relation zu nicht-phosphorylierten Peptiden in einem komplexen Gemisch verbessert und eine Ionensuppression bei der massenspektrometrischen Vermessung vermindert werden:

„Immobilisierte Metall Affinitätschromatographie“ (IMAC) basiert auf der starken Affinität der Phosphate gegenüber Metallionen, wie  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  und  $\text{Zr}^{3+}$  [68,69] (Abb. 1-8 A). Um den Nebeneffekt einer Bindung stark saurer Peptide mit hohen Anteil an Glutamin- und Asparaginsäure zu reduzieren, kann zusätzliche eine Methylierung aller sauren Peptide durchgeführt werden [70]. Eine weitere effektive Anreicherungsform stellt die Bindung phosphorylierter Peptide an Titandioxid ( $\text{TiO}_2$ ) [71] dar, welche für eine nachfolgende Identifizierung an eine LC-MS/MS gekoppelt werden kann [72]. Larsen und Kollegen erhöhten die Spezifität gegenüber phosphorylierten Peptiden durch die Zugabe von 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als kompetitiver Binder zur Verminderung der Anreicherung saurer, nichtphosphorylierter Peptide (Abb. 1-8 B) [73].



**Abb. 1-8: Phosphopeptidanreicherung über** (A) IMAC, welches auf der hohen Affinität der Phosphate gegenüber Metallionen (hier  $\text{Fe}^{3+}$ ) basiert und (B)  $\text{TiO}_2$ , hier im Komplex mit DHB. Die Affinität von  $\text{TiO}_2$  zu Phosphaten ist höher als die zu DHB, während saure Aminosäurereste eine geringere Spezifität aufweisen. Die Zugabe von DHB als kompetitiven Binder vermindert somit eine Bindung nicht-phosphorylierter saurer Peptide an  $\text{TiO}_2$ . [65]

Einige Phosphoproteomstudien, wie die 2008 durchgeführte Analyse solider, maligner Melanome von Mäusen mit TG3-Mutation [74] oder das von Villén und Kollegen untersuchte murine Leberkrebsmodell [75], kombinierten für eine höhere Ausbeute  $\text{TiO}_2$  bzw. IMAC in einer 2-Stufen-Prozedur mit einer Ionenaustauschchromatographie i.d.R. SCX („Strong Cation Exchange“).

Grundsätzlich werden Phosphorylierungen an Kinasen bei Gesamtphosphoproteom-Studien im Vergleich zu phosphorylierten Peptiden der Substratproteine mit einer geringeren Effizienz in der Massenspektrometrie detektiert ([76]: 2%; [77]: 5.8%; [74]: 4.5%; [75]: 11%). Um die Sensitivität gegenüber Kinasen zu erhöhen, können Antikörper-basierte Verfahren [78] oder immobilisierte Kinaseinhibitoren zur ATP-kompetitiven Bindung und Anreicherung eingesetzt werden.

### **ATP-kompetitive Inhibitoren zur Anreicherung von Kinasen**

Um die niedrig-exprimierten Kinasen zu charakterisieren ist es notwendig sie anzureichern. Im Jahr 1985 wurden erstmalig die Proteinkinase C, sowie die cAMP- und die cGMP-abhängigen Proteinkinasen basierend auf einer Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Isoquinolinesulfonamid, H9, angereichert [79]. In Kombination mit der heutigen sensitiven Massenspektrometrie dienen immobilisierte ATP-kompetitive Kinaseinhibitoren auf der einen Seite zur Bestimmung der Selektivität eines Inhibitors und damit auch der Wirkstoffcharakterisierung [80,81]. Auf der anderen Seite wurde die chemische Proteomik bei systematischen Analysen eingesetzt, um u.a. Zellzyklus-abhängige Kinaseregulation zu dokumentieren [82] oder Signaltransduktionsprozesse nach InlB-vermittelter MET-Aktivierung zu untersuchen [83].

Der immobilisierte ATP-kompetitive Inhibitor für derartige, systematische Analysen sollte dabei möglichst selektiv gegen Kinasen sein, sich aber durch ein breites Spektrum bezüglich der Verteilung auf die Kinasegruppen auszeichnen. In vorherigen Studien wurden oftmals der CDK-Inhibitor Purvalanol B und das Pyrido[2,3-d]-Pyrimidin-Derivat PP58 verwendet, die jeweils eine Ausbeute von über 80 Kinasen aufwiesen [84]. Eine Steigerung der Affinität konnte durch die Entfernung der Dichlorphenylgruppe am PP58 erreicht werden. Das dabei entstandene Derivat, V16743, deckt mit 106 Kinasen aus HeLa S3-Zellen ein sehr breiteres Spektrum der Kinasen ab [83,85]. Durch die Modifikation des Inhibitors wurden vor allem Kinasen angereichert, die sich durch eine große Gatekeeper-Aminosäure kennzeichnen [86]. Diese spezielle Aminosäure sitzt bei über 70% der

Kinasen am Eingang der hydrophoben Tasche der ATP-Bindungsdomäne und vermindert, sterisch betrachtet, eine effektive Einlagerung des Dichlorphenylrings [87]. Diese unspezifische, aber selektiv gegen Kinasen gerichtete Bindung kann als Grundlage weiterer systematischer Analysen dienen, um interessante biologische Fragestellungen zur Tumorphysiologie bezüglich Kinasen, Phosphorylierungen und Signalwege zu erörtern.

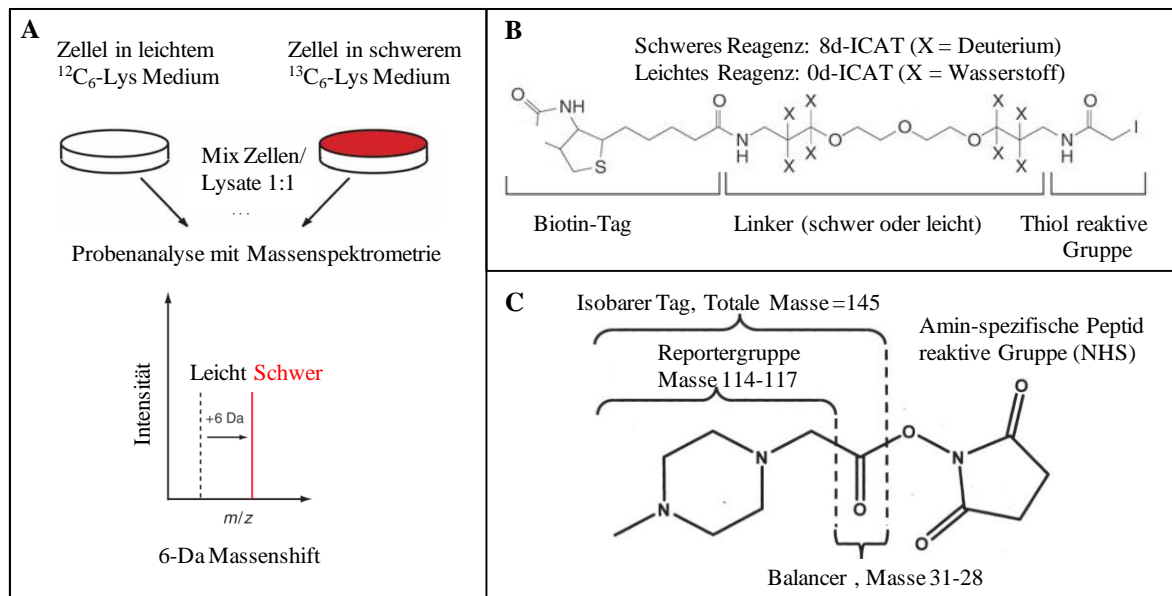
### Quantifizierungsstrategie

Für eine vergleichende Analyse differenzieller Proben (gesundes vs. krankes Gewebe, Wildtyp vs. Mutante, Kontrolle vs. Stimulation) können für die relative und absolute Quantifizierung mehrere auf Proteomik basierende Strategien eingesetzt werden [65].

**2D-GE:** Die Kombination aus fluoreszierenden Farbstoffen und zur Auswertung bereitstehenden Software-Paketen (z.B. Delta2D von DECODON) ermöglicht neben einer relativen mittlerweile auch eine absolute Quantifizierung [88]. Die Identifizierung veränderter Proteine erfolgt anhand eines Mastergels oder anschließendem in-Gel-Verdau und MS-Analyse. Dennoch treten bei 2D-GE z.B. im Bereich der Visualisierung schwach exprimierter Proteine oder der Detektion differenzieller Phosphorylierungsstellen Limitationen auf. Für diese systematischen Analysen eignen sich gel-freie Quantifizierungsstrategien, wie SILAC<sup>TM</sup>, ICAT<sup>®</sup> [89] oder iTRAQ<sup>TM</sup>, die auf der Markierung verschiedener Proben mit unterschiedlich schwerer Isotopen basiert und deren Quantifizierung in der Massenspektrometrie erfolgt. **SILAC** (‘stable isotope labelling with amino acids in cell culture’) beschreibt eine metabolische Markierung, bei der im Verlauf der Kultivierung schwere und leichte Aminosäuren (z.B.: <sup>12</sup>C- und <sup>13</sup>C-Atome in Arginin oder Lysin) eingebaut werden (Abb. 1-9). Die Proben können vereint, verdaut und anschließender mittels MS analysiert werden. Die markierten Peptide gleicher Sequenz verhalten sich biochemisch identisch, kennzeichnen sich jedoch in Abhängigkeit der Art und Menge der isotopenmarkierten Aminosäure, durch einen Massenshift im Spektrum. Das Verhältnis der Signalintensitäten lässt Rückschlüsse über die relativen Mengen der einzelnen Proteine zu und ermöglicht eine relative Quantifizierung [90,91].

Bei der **iTRAQ**-Methode (‘isobaric-tag for relative and absolute quantification’) werden am N-Terminus oder den Lysinseitenketten proteolytisch verdauter Peptide unterschiedliche isobare Massen gekoppelt (Abb. 1-9) [92]. Die iTRAQ-Moleküle bestehen jeweils aus einem Reporter und einem Balancer. Der Balancer (31- 28 Da) gleicht die Massen der Reporter (4plex: 114, 115, 116 oder 117 Da) aus, so dass im Vergleich der Proben keine Massenunterschiede bezogen auf ein sequenzidentisches Gesamtpeptid

vorliegen ( $iTRAQ = 145.1 \text{ DA}$ ). Die getrennt voneinander markierten Proben können daraufhin vereinigt werden. Erst in der Kollisionszelle im MS/MS-Modus werden Reporter und Balancer vom Peptid abgespalten. Im Peptidspektrum treten die Reporterionen im niedermolekularen Massenbereich auf und beeinträchtigen nicht den für die Identifizierung eines Peptides bzw. einer Phosphorylierung benötigten Massenbereich. Der direkte Vergleich der Ionenintensitäten der Reporter ermöglicht eine relative Quantifizierung der Proben.  $iTRAQ$  hat gegenüber SILAC den Vorteil, nach der Proteinextraktion eingesetzt zu werden und sowohl für Zellkulturstudien als auch bei der Analyse von Gewebeproben geeignet zu sein. Quantitative Proteomik basierend auf Massenspektrometrie wurde bereit in verschiedensten Krebsstudien unter Verwendung von SILAC [77,93-95], ICAT [96,97] oder  $iTRAQ$  [98-101] angewendet.



**Abb. 1-9: Die Quantifizierungsstrategien SILAC, ICAT und  $iTRAQ$ .** (A) SILAC: Das Zellwachstum in Medium mit der stabilen Isotop-markierten Aminosäure Lysin mit sechs  $^{13}\text{C}$ s (rot) führt zur metabolischen Markierung des gesamten Proteoms. Verdaut Proteine enthalten Lys-C oder das markierte Lys- $^{13}\text{C}$ . In der Massenspektrometrie verhalten sich die Peptide chemisch gleich und können lediglich durch einen Massenshift von 6 DA unterschieden werden. Die Intensität der MS Signale der leichten und schweren Peptide spiegelt die relative Häufigkeit zueinander wider. Abbildung modifiziert nach Ong und Mann [87] (B) Die Markierung mittels ICAT basiert auf zwei Formen (schwere und leichte), bedingt durch einen Austausch von 8 H-Atomen gegen Deuterium im Linker. Dieser Bereich verbindet eine thiolreaktive Gruppe, welche bei reduzierten Proteinen an die freien Thiolgruppen der Cysteine bindet, mit einem Affinitätstag (Biotin), der im Anschluss zur Isolierung der markierten Peptide dient [201]. (C) Das komplette  $iTRAQ$ -Molekül besteht aus einem Reporter, einer Massenausgleichsgruppe (Balancer) und einer Peptid-reaktiven Gruppe. Die Massen der Reportergruppen variieren von m/z 114.1 bis 117.1 Da, während mit Massen von 28 bis 31 Da ein Ausgleich eingerichtet wird. Bei der Reaktion mit einem Peptid kommt es zur Verknüpfung mit dem N-Terminus oder der sekundären Aminogruppe von Lysin. Bei der Fragmentierung des  $iTRAQ$ -Moleküls geht der Balancer verloren. Lediglich die Reporterionen treten im niedermolekularen Massenbereich auf. Ihre Intensitäten dienen der relativen Quantifizierung. [92]



## 2. ZIELSETZUNG

Als wichtige Komponenten der Signalwege beeinflussen Proteinkinasen die Aktivität, Lokalisation und Interaktionsfähigkeit ihrer Substrate. Durch Veränderungen ihrer Aktivität können Proteinkinasen die Zellphysiologie beeinflussen und an der Entwicklung von Tumoren beteiligt sein [35]. Damit stellen Proteinkinasen durch ihre Schlüsselfunktion in der Signaltransduktion ein attraktives Ziel in der Krebstherapie dar [21].

Seit 2006 sind die Kinaseinhibitoren Sorafenib, Sunitinib und Temsirolimus als Medikamente gegen das Nierenzellkarzinom zugelassen. Ein signifikanter Anstieg der durchschnittlichen Überlebensrate von Wochen bzw. Monaten im Vergleich zu der systematischen Zytokin-Therapie oder systemischen Ansätzen, wie Strahlen- oder Chemotherapie, konnte verzeichnet werden. Jedoch variiert die Antwortrate in Abhängigkeit des Patienten. Diese zielgerichtete Therapie geht für den Großteil der Patienten mit einer verbesserten Verträglichkeit einher [102], dennoch zeigen die vorhandenen Nebenwirkungen die Notwendigkeit neuer therapeutischer Ansätze [103].

Um perspektivisch Kinaseinhibitoren zu entwickeln oder die Anwendbarkeit bereits vorhandener Kinaseinhibitoren zu prüfen, ist eine Erforschung deregulierter Kinasen und Signalwege im Nierenzellkarzinom notwendig.

Ziel, der hier vorliegenden Arbeit, ist die Anreicherung und Charakterisierung von Kinasen und deren Phosphorylierungen aus *ex-vivo* Gewebe des Nierenzellkarzinoms und gesundem, korrespondierenden Nierenparenchym. Im ersten Schritt der experimentellen Strategie soll geprüft werden, ob Kinasen unter Verwendung chemischer Proteomik direkt aus Gewebelysat angereichert werden können. Um eine möglichst umfassende Analyse und Charakterisierung von Kinasen und deren Phosphorylierungen durchzuführen, sollen dafür immobilisierte, niedermolekulare ATP-kompetitive Inhibitoren verwendet werden, die eine unspezifische aber selektiv gegen Kinasen gerichtete Bindung aufweisen [83,84]. Sofern eine Anreicherung von Kinasen aus dem Gewebe möglich ist, sollen durch quantitative Analysen des Kinoms RCC-spezifische Regulationen identifiziert werden. Der Einfluss Patienten-abhängiger Veränderungen soll durch die Entnahme der Gewebeproben von einem Patienten verringert und durch einen Vergleich der gesunden Gewebe untereinander zusätzlich beurteilt werden. Mit den generierten Phospho-Kinom-Regulationsprofilen sollen verschiedene Stadien die Tumorentwicklung und Ausbreitung des Nierenzellkarzinoms abgedeckt werden, um zu analysieren, welche Signalwege und physiologischen Prozesse im Nierenzellkarzinom generell verändert vorliegen.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 CHEMIKALIEN, REAGENZIEN UND PUFFER

**Tab. 3-1: Allgemeine Chemikalien und Reagenzien**

Bezeichnung	Produktnummer	Hersteller
1,4-Dithiothreitol $\geq 99\%$ (DTT)	20710	Serva
Albumin Rinderserum $\geq 98\%$	A7906	Sigma
Ammonium-Dihydrogen-Phosphat 99.99+%	467782	Sigma
Ammoniumphosphat (APS)	13375	Serva
Benzonase	1.01695.001	Merck
Complete Protease Inhibitor Cocktail	04693116001	Roche
Complete Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-frei	04693132001	Roche
Coomassie Brilliant Blue G250	17524	Serva
EDTA	108418	Merck
EGTA	E4378	Sigma
HEPES Pufferan® $\geq 99.5\%$	9105.3	Roth
Glycin $\geq 99\%$ p.A.	3908.2	Roth
Glycerin $\sim 86\%$ p.A.	4043.5	Roth
Igepal® CA-630 (für Molekularbiologie) I8896 Sigma	I8896	Sigma
Lumi-Light Western Blotting Substrat	12015200001	Roche
LiChroprep RP-18	1.09303.0100	Merck
Natrium-Chlorid $\geq 99.5\%$ p.A. (NaCl)	3957.1	Roth
Natrium Orthovanadat $\geq 90\%$ (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	S6508	Sigma
Natriumfluorid 99.99 Suprapur® (NaF)	1610302	Merck
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	P2850	Sigma
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	P5726	Sigma
Rotiphorese® Gel 30 (37.5:1)	3029.1	Roth
TEMED 99% p.A.	2367.3	Roth
Triethylammonium Bicarbonat Puffer p.A. for HPLC (TEAB)	17902	Fluka
Trifluor-Essigsäure $\geq 99.5\%$ (TFA)	91699	Fluka
Triton® X100	T9284	Sigma
Trizma® base $\geq 99.9\%$ (Tris)	T1503	Sigma
Tween® 20	9127.1	Roth

### **3.2 ALLGEMEINE VORSCHRIFT ZUM ANSETZEN VON LÖSUNGEN UND PUFFER**

Die Zusammensetzungen von Lösungen und Puffern werden in den dazugehörigen Kapiteln angegeben. Zum Ansetzen der Lösungen und Puffer wurde deionisiertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O  $\approx$  MilliQ, MQ) verwendet, das über MembranPure (Astacus) aufbereitet wurde. Wenn notwendig erfolgte das Einstellen des pH-Wertes mit 16%er HCl, konzentrierter HCl, 1M NaOH oder konzentrierter Essigsäure an dem pH-Meter HI 221 (Hanna Instruments). Ethanol (EtOH, #8006), Methanol (MeOH, #8045), Acetonitril (ACN, #9017) wurden für Lösungen in p.A. Reinheit vom Hersteller J.T. Baker bezogen.

### **3.3 ALLGEMEINE BIOCHEMISCHE METHODEN**

#### **3.3.1 PROTEIN-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG MITTELS BCA**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit [104]. Für die Konzentrationsbestimmung der zu untersuchenden Probe wurden verschiedene Verdünnungsstufen (1:5, 1:10, 1:20) einer Proteinprobe hergestellt. Für eine Dreifachmessung wurden je 25  $\mu$ l der Proben und 200  $\mu$ l des, im Verhältnis von 1:50, hergestellten Protein-Assay Reagenz in einer Mikrotiter-Platte vermischt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C erfolgte die Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 562 nm (Infinite M200, Tecan GmbH). Anhand einer mitgeführten BSA-Kalibrierung konnten die Messungen in Proteinkonzentrationswerte umgerechnet werden.

#### **3.3.2 EINDIMENSIONALE SDS-PROTEINGELELEKTROPHORESE**

Die eindimensionalen SDS-Proteingelelektrophorese (Laemmli, 1970) [105] und damit die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte im Minigel-System von Biometra (86x77x1mm). Das Sammel- und Trenngel wurden entsprechend dem gewünschten Acrylamid/Bis-Anteil, wie in Tab. 3-3 aufgelistet, angesetzt. Die zu trennenden Proteinproben wurden nach Zugabe von 4x Probenpuffer für zehn Minuten bei 80°C erwärmt. Vor dem Probenauftrag auf das Gel wurden die Proben für zwei Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Nach der Aufbereitung der Proben können die Proben bei -20°C gelagert oder direkt folgend mit SDS-PAGE weiter verarbeitet werden.

Dafür wurde die gewünschte Menge bzw. Proteinkonzentration der Proben in Geltaschen gefüllt. Für die Gesamt-Gewebelysat-Analysen wurden 30 µg verwendet. Als Größenstandard diente der PageRuler™ Plus/ PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#SM1811/ #SM0671). Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V. Dabei wandern die in der Lösung befindlichen Proteine durch das Anlegen einer Spannung zum positiven Pol. Nach Erreichen des Gelendes, erkennbar an der Bromphenolblau-Bande, wurde der Lauf beendet. Die aufgetrennten Proteine konnten anschließend entweder Coomassie-Blue gefärbt (Abschnitt 3.3.3) oder mittels Western Blot (Abschnitt 3.3.4) analysiert werden.

**Tab. 3-2: Zusammensetzung für Trenn- und Sammelgel**

Lösungen	Sammelgel	Trenngel (zur Polymerisation überschichtet mit H <sub>2</sub> O)			
	4.2%	8%	10%	12%	15%
<b>SDS- Puffer A</b>	-	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
<b>SDS- Puffer B</b>	2.5ml	-	-	-	-
<b>MQ</b>	6.1ml	4.8ml	4.2ml	3.5ml	2.5ml
<b>Acrylamid/Bis (37,5:1)</b>	1.4ml	2.7ml	3.3ml	4ml	5ml
<b>TEMED</b>	30µl	20µl	20µl	20µl	20µl
<b>APS, 10%</b>	60µl	50µl	50µl	50µl	50µl

**Tab. 3-3: Lösungen der eindimensionalen SDS-Proteingelelektrophorese**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration	Anmerkung
<b>SDS- Puffer A</b>	Tris	1.5 M	pH 8.8 (HCl)
	SDS	14 mM	
<b>SDS- Puffer B</b>	Tris	0.5 M	pH 6.8 (HCl)
	SDS	14 mM	
<b>10x Elektrodenpuffer</b>	Glycin	1.99 M	pH 8.9
	Tris-Base	0.24 M	
	SDS	35 mM	
<b>4xSDS- Probenpuffer</b>	Tris-Base (pH6.8, HCl)	0.24 M	pH 6.8 (HCl)
	Glycerin	40% (v/v)	
	2-Mercaptoethanol	12% (v/v)	
	SDS	0.27M	
	Bromphenolblau	0.004% (w/v)	

### 3.3.3 PROTEINFÄRBUNGEN

Nach Beenden der Elektrophorese wurde die Färbemethode Collodial Coomassie Blue Silver [106] verwendet, um im SDS-Polyacrylamid-Gel die aufgetrennten Proteine anzufärben. Dazu wurde das Gel mit Fixierlösung fixiert (2x 30 min), anschließend gewaschen (2x10min) und in Coomassie Silver über Nacht gefärbt (1x Wechsel der Färbelösung). Die Zusammensetzung der Lösungen sind in Tab. 3-4 zu sehen. Die Entfärbung erfolgt mit MQ. Für die digitale Dokumentation wurden die Gele an einem Durchlichtscanner (PowerLookIII, UMAX) eingescannt.

**Tab. 3-4: Zusammensetzung der Färbelösung und anderer benötigter Komponenten**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration
<b>Fixierlösung</b>	EtOH	30% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
<b>Coomassie Silver nach Candiano</b>	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85%)	10% (v/v)
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10% (w/v)
	MeOH	20% (v/v)
	Coomassie BB-G-250	0.12% (w/v)

### 3.3.4 WESTERN BLOT UND IMMUNODETEKTION

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF Membran (Immuno-Blot™ PVDF Membran, 0,2 µm, #162-0177, Biorad) transferiert. Dazu wurden die Minigele nach Beendigung der Elektrophorese zweimal 10 min in 1x Blot-Puffer gewaschen und die PVDF-Membran 5 min in Methanol. Anschließend wurden die Membran, wie auch das verwendete Filterpapier, in Blot-Puffer äquilibriert. Das Zusammensetzen der Blotapparatur (Trans-Blot® SD, Semi-Dry Transfer Cell, #170-3957, Bio-Rad) erfolgte luftblasenfrei nach den Angaben des Herstellers. Die Proteine wurden bei 25 V und berechneter Stromstärke ( $0.85 \text{ mA/cm}^2$ ) 70 min geblottet. Nach Beendigung des Blotvorgangs wurde die Membran für mindestens 30 min in Blockierlösung geschüttelt. Bei der Phospho-spezifischen Immundetektion wurde BSA anstelle von Magermilchpulver zum Blocken der Membran verwendet. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper mit angegebener Verdünnung in Blockierlösung bei

4°C über Nacht (Tab. 3-6). Die Membran wurde am darauffolgenden Tag für mindestens eine Stunde mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert (Tab. 3-7). Zwischen den beiden Inkubationsschritten wurden jeweils 10-minütige Waschschrte mit TBS-T, TBS-T/NaCl, TBS-T/Triton X-100 und TBS-T durchgeführt (Tab. 3-8). Nach der Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper genügte ein dreimaliges 10-minütiges Waschen mit TBS-T. Für die Detektion wurde die Membran mit HRP-Substrat-Lösung (Lumi-Light Western Blot Substrate, Roche) benetzt. Die HRP-katalysierten Chemilumineszenz-Signale des Sekundär-Antikörpers wurden durch eine CCD-Kamera (Fujifilm LAS3000, Raytest) gemessen.

**Tab. 3-5: Verwendete Puffer für die Western Blot-Analyse**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration	Anmerkung
<b>Blot-Puffer 10x</b>	Tris	0.25 M	pH 8.3 (HCl)
	Glycin	1.92 M	
	SDS	35 mM	
<b>Blot-Puffer 1x</b>	BlotPuffer (10x)	10% (v/v)	
	MeOH	20% (v/v)	

**Tab. 3-6: Liste verwendeter primärer Antikörper**

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung	Katalog Nr.	Hersteller
<b>Actin (20-33)</b>	Kaninchen, polyklonal	1:2000	A5060	Sigma
<b>Actin</b>	Maus, monoklonal	1:2000	A5441	Sigma
<b>CDK2 (D12)</b>	Maus, monoklonal	1:250	sc-6248	Santa Cruz
<b>LRRK2</b>	Kaninchen, polyklonal	1:1000	NB300-268	Novus Biological
<b>MET (C-12)</b>	Kaninchen, polyklonal	1:1000	sc-10	Santa Cruz
<b>MST1 (STK4)</b>	Kaninchen, monoklonal	1:1000	1941-1	Epitomics
<b>p-p42/44 MAPK (Thr202/Tyr204)</b>	Kaninchen, polyklonal	1:1000	9101	Cell Signaling
<b>P44/42 MAPK</b>	Kaninchen, polyklonal	1:1000	9102	Cell Sig.
<b>PCTK3</b>	Kaninchen, polyklonal	1:250	PAB2948	Abnova
<b>Rsk2</b>	Maus, monoklonal	1:250	sc-9986	Santa Cruz

**Tab. 3-7: Liste verwendeter sekundärer Antikörper**

Bez.	Spezifität	Konjugate	Verdünnung	Hersteller
<b>A4a</b>	Ziege- $\alpha$ -Maus IgG/IgM	Peroxidase (HRP)	1:2000	Jackson ImmunoResearch
<b>B4c</b>	Ziege- $\alpha$ -Kaninchen IgG/IgM	Peroxidase (HRP)	1:2000	Jackson ImmunoResearch
<b>G4c</b>	Esel- $\alpha$ -Ziege-IgG	Peroxidase (HRP)	1:2000	Jackson ImmunoResearch

**Tab. 3-8: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für Immunodektion**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration	Anmerkung
<b>10x TBS</b>	Tris NaCl	0.2 M 1.37 M	pH 7.5
<b>TBS-T</b>	TBS (10x) Tween 20	10% (v/v) 0.1% (v/v)	
<b>TBS-T/NaCl</b>	TBS-T NaCl	0.5 M	
<b>TBS-T/Triton X-100</b>	TBS (10x) Triton X-100	0.5%	
<b>Blockierlösung</b>	TBS-T Magermilchpulver/BSA	5% (w/v)	Bei phospho-spezifischer Detektion 5% BSA

### 3.3.5 ANTIKÖRPER- DESORPTION

Bei der Verwendung mehrerer Primär-Antikörper nacheinander wurden nach der Detektion die Sekundär-Antikörper von der PVDF-Membran entfernt. Dazu wurde die Membran durch zehnminütige Waschschrte mit Puffer A und Puffer B gewaschen (Tab. 3-9). Nach einem erneuten 60-minütigen Blockier-Schritt in entsprechender Blockierlösung konnte die Membran mit dem nächsten Primär-Antikörper inkubiert werden.

**Tab. 3-9: Verwendete Puffer zur Antikörper-Desorption**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration	Anmerkung
<b>Puffer A</b>	Glycin	0.2 M	pH 2 (16% ige HCl)
	NaCl	0.5 M	
<b>Puffer B</b>	Tris-Base	0.5 M	pH 11 (NaOH)

### 3.4 GEWINNUNG HUMANER EX-VIVO GEWEBEPROBEN

Bei der radikalen Nephrektomie wird dem Patienten die komplette Niere inklusive des Nierentumors entfernt. Eine solche Operation ist die Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente. In den meisten Fällen erfolgte die Nephrektomie durch einen Flankenschnitt in einer offenen Operation. Bei den Patient 011 wurde eine sogenannte laparoskopische Operation durchgeführt. Bei diesem minimal- invasiven chirurgischen Eingriff handelt es sich um ein schonenderes Verfahren, welches im Gegensatz zu den Schnittoperationen die postoperative Lebensqualität erhöht.

Von der Niere konnten direkt im Operationssaal zwei kleine Gewebestücke aus dem Tumor, aber auch aus dem gesunden Gewebe geschnitten werden. Die Präparation der Niere erfolge direkt nach der operativen Entnahme und wurde von Assistenzärztin Kathrin Haberecht durchgeführt. Dabei wurde die Niere mit dem Tumor längs aufgeschnitten. Die Gewebestücke wurden in vorgekühlte 50ml- Falkonröhrchen überführt und direkt auf dem mitgeführten Trockeneis gelagert.

Bei den Gewebeproben der gesunden Gewebe handelte es sich um Bereiche des Nierenparenchyms, die sich in möglichst weiter Entfernung vom erkrankten Gewebe befanden. Bei der Entnahme der Tumorproben war es notwendig keine Randgebiete zu verletzen, da diese später für die pathologische Begutachtung der Infiltration wichtig sind. Eine Auflistung der Proben entsprechend dem pathologischen Bericht, findet sich in Tab. 3-10. Nach dem Transport auf Trockeneis wurden die Gewebeproben bei -70°C bis zur weiteren Aufbereitung für die Phospho-Kinom-Studie gelagert. Durch die sofortige Lagerung auf dem mitgeführten Trockeneis und nachfolgend bei -70°C soll sowohl die Degradation als auch die Dephosphorylierung der Proteine verhindert werden.



**Tab. 3-10: Charakterisierung der Tumorproben**

Patient Nr.	Alter	♀/♂	RCC- Karzinomtyp	TNM* Klassifizierung	Grad	Ausmaße des Tumors
002 <sup>+</sup>	50	♂	klarzellig	pT2	2	8.5 x 8.0 x 5.8 cm
003 <sup>+</sup>	39	♂	chromophob	pT2	2	15.0 x 9.0 x 6.0 cm
004 <sup>+</sup>	67	♀	klarzellig	pT3a	2	12.5 x 8.0 x 7.5 cm
007 <sup>+</sup>	86	♂	klarzellig	pT3b pM1 (OSS)	2	5.5 x 5.4 x 4.6 cm
008 <sup>+</sup>	66	♀	klarzellig	pT4 M1	2 - 3	7.5 x 7.0 x 5.0 cm
011 <sup>+</sup>	68	♀	klarzellig	pT2	2	8.0 x 5.5 x 5.7 cm
001	77	♂	klarzellig	pT3b	2	7.0 x 5.0 x 4.0 cm
005	60	♀	klarzellig	pT1b	1	4.3 x 3.0 x 2.8 cm
006	77	♀	klarzellig	pT1b	1	4.6 x 3.5 x 3.5 cm
009	60	♂	klarzellig	pT2	2	1.0 x 1.5 x 9.0 cm
010	66	♂	klarzellig	pT3b M1 (ADR)	2	Nicht bekannt
012	61	♀	klarzellig	pT1a	1	Nicht bekannt

<sup>+</sup> Kennzeichnet die Patienten, deren Probe für die nachfolgende quantitative Phospho-Kinom-Studie ausgewählt wurden

\* T - Einordnung der Tumorgroße

M - Metastasierung anderer entfernter Organe/ Körperbereiche

OSS = ossäre Metastase im Halswirbelkörper 5

ADR = Nebennierenmetastase

### 3.5 QUANTITATIVE PHOSPHOKINOM-ANALYSE

#### 3.5.1 AUFBEREITUNG HUMANER *EX-VIVO* GEWEBEPROBEN

Da die Arbeiten mit menschlichem Material durchgeführt wurden, musste die Aufbereitung der Gewebe im S2-Labor erfolgen.

Die entnommenen Gewebeproben wurden auf Eis angetaut und mit einem frischen Skalpell in kleinere Stücke geschnitten. Dieser Bearbeitungsschritt erleichterte das Mörsern der Proben unter flüssigem Stickstoff. Der Mörser und das Pistill wurden bereits einen Tag vorher bei -20°C kühl gestellt. Das gewonnene Gewebe-Pulver wurde in vorgekühlte 50-ml-Falconröhrchen überführt und auf einer Waage gewogen. Anschließend wurden die Proben in 30 ml Lysispuffer aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (4 x 20 Einheiten/min, bestehend aus Intervall von 1.5 Sek. Schall und 1.5 Sek. Pause, Sonoplus GM3200, Bandelin). Zwischen den einzelnen Ultraschall-Zyklen wurden

die Proben immer wieder gekühlt. Zu den aufgeschlossenen Zellsuspensionen wurden 10 µl Benzonase hinzugegeben. Um die Proben von Verunreinigungen und unlöslichen Zellbestandteilen zu trennen, wurden sie eine Stunde bei 100000 g ultrazentrifugiert (Avanti J-30 I, Beckman Coulter, Rotor JS-24.15). Bei den Tumorzellsuspensionen bildete sich dabei eine Lipidschicht auf dem Lysat, die vorsichtig mittels Wattestäbchen abgenommen wurde. Die Überstände aller Ansätze wurden abschließend durch vorgekühlte 0.45 µm-Spritzenfilter (Sterivex<sup>TM</sup>-HV, #SVHVL10RC, Millipore) in vorgekühlte 50ml- Falconröhrchen filtriert. Bevor die Lysate zum nächsten Schritt, der Kinase-selektiven Affinitäts-Chromatographie, gegeben wurden, erfolgte eine Protein-Konzentrationsbestimmung mittels BCA (Abschnitt 3.3.1).

**Tab. 3-11: Für die Aufbereitung humaner Gewebeproben benötigte Puffer**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration	Anmerkung
<b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></b> (Stocklösung)	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	0.2 M	In deionisiertem Wasser (ddH <sub>2</sub> O ~ MilliQ, MQ) lösen, bis zum Klarwerden kochen pH 10 Lagerung -20°C
<b>NaF</b> (Stocklösung)	NaF	0.5 M	Unter Wärmezufuhr in MQ lösen Lagerung -20°C
<b>Lysispuffer</b>	Hepes NaCl Triton-X100 EDTA EGTA Phosphataseinhibitorcocktail I (Sigma) Phosphataseinhibitorcocktail II (Sigma) NaF Na <sub>2</sub> (VO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Complete (Proteaseinhibitorcocktail)	50 mM 1 M 1% 1 mM 1 mM 1% 1% 10 mM 2.5 mM 1 Tablette	pH 7.5, NaOH          auf 50 ml

### 3.5.2 KINASE- SELEKTIVE AFFINITÄTS-CHROMATOGRAPHIE

In dieser Arbeit wurden Affinitäts-Säulen mit den Kinaseinhibitoren V16743 [83] und Purvalanol B (PurB, Tocris) verwendet. Für die Kinase-Affinitätsmatrix wurden die Kinaseinhibitoren an ECH-Sepharose 4B gekoppelt (wie bereits beschrieben [83,84]). Für die Aufreinigung der Kinasen wurden mit V16743- und mit PurB-Material gepackte Tricorn 5/50-Säulen in Reihe geschaltet.

Pro Experiment wurden vier Patienten-Proben (2x gesundes-, 2x Tumor-Gewebe) parallel untersucht. Entsprechend wurden jeweils vier Säulenpaare benötigt (Tab. 3-12)

**Tab. 3-12: Verwendete Säulen und Proteinmengen**

Experiment	Probe	Eingesetzte Menge	Säule – V16743	Säule - PurB
I	Nierengewebe 002	75 mg	A3	A3
	Tumorgewebe 002	75 mg	A4	A4
	Nierengewebe 003	45 mg	A1	A1
	Tumorgewebe 003	45 mg	A2	B2
II	Nierengewebe 004	65 mg	A4	A4
	Tumorgewebe 004	65 mg	A3	A3
	Nierengewebe 007	75 mg	A2	B2
	Tumorgewebe 007	75 mg	A1	A1
III	Nierengewebe 008	75 mg	B4	B4
	Tumorgewebe 008	75 mg	B3	B3
	Nierengewebe 011	75 mg	A4	B1
	Tumorgewebe 011	75 mg	A3	B2

Die Lagerung der Säulen, in 20% Ethanol, und die Affinitäts-Chromatographie wurden bei 4°C durchgeführt. Zur Verwendung wurden die Säulen zuerst auf MQ umgepuffert, um anschließend mindestens dem 30ig-fachem an Säulenvolumina durch Puffer A äquilibriert zu werden. Nach Aufbereitung der Gewebeproben wurden die Gewebelysate über eine externe Pumpe in einen Loop geschleust. Dieser diente der gleichmäßigen Probenauftragung (1 ml/h über Nacht). Nach dem kompletten Durchlauf der Proben und der damit verbundenen Anreicherung der Kinasen wurden die Säulen zuerst über Nacht bei 3 ml/h mit Puffer A und anschließend noch einmal 2 h bei 5 ml/h mit Puffer B gewaschen. Der Puffer B enthielt 100 mM NaCl und diente der Erniedrigung des Salzgehaltes auf den

Säulen. Zur Elution wurden die Säulen aus dem System genommen und bei Raumtemperatur akklimatisiert. Mit einer Flussrate von 6ml/h wurden die gebundenen Proteine unter denaturierenden Bedingungen (Elutionspuffer) gegen die Auftragsrichtung eluiert. Von dem Eluat wurden elf Fraktionen mit einem Volumen von je 1ml gesammelt. Von jeder Fraktion wurde ein 10% (Experiment I) bzw. 5% (Experiment II und III)-Aliquot auf einem SDS-Gel (12%iges) aufgetrennt und mit Coomassie Blue Fast Silver angefärbt. Zusätzlich wurde ein LMW-SDS Marker (GE Healthcare, 17-0446-01) mitgeführt, um eine Proteinbestimmung der einzelnen Fraktionen nach der Färbung zu ermöglichen. Nach Überprüfung der vollständigen Elution wurden die Proben vereint und auf maximal auf 10% des Ausgangsvolumens eingengt.

**Tab. 3-13: Benötigte Puffer für die Kinase-selektive Affinitätschromatographie**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration	Anmerkung
Puffer A	Hepes	50 mM	pH 7.5, NaOH
	NaCl	1 M	
	Triton-X100	0.1%	
	EDTA	1 mM	
	EGTA	1 mM	
	NaF	10 mM	
	Na <sub>2</sub> (VO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2.5 mM	
Puffer B	Hepes	50 mM	pH 7.5, NaOH
	NaCl	0.1 M	
	Triton-X100	0.1%	
	EDTA	1 mM	
	EGTA	1 mM	
	NaF	10 mM	
	Na <sub>2</sub> (VO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.1 mM	
Elutionspuffer	SDS	0.5%	Puffer wurde entgast und gefiltert
	DTT	1 mM	

### 3.5.3 PROTEINAUFREINIGUNG

#### Wessel-Flügge- Fällung

Die vereinigten Elutions-Fractionen jedes Ansatzes wurden nach dem Protokoll von Wessel und Flügge [107] ausgefällt.

**Tab. 3-14: Ansatz zur Wessel-Flügge Fällung**

Reagenzien	Eingesetztes Volumen	Anmerkung
Probe	ddH <sub>2</sub> O	
Methanol	4x X Volumen	kurz schütteln
Chloroform	1x X Volumen	kurz schütteln
ddH <sub>2</sub> O	3x X Volumen	kurz schütteln

Beim Zentrifugieren kam es zur Bildung zweier Phasen (4000 g, 6 Min). Der wässrige Überstand wurde vorsichtig bis zur Interphase abgenommen. Durch die Zugabe von 3x Volumen Methanol wurde die Phasengrenze durchbrochen und die ausgefällten Proteine wurden durch Zentrifugation für 15 min pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Das Pellet wurde unter dem Abzug getrocknet.

#### Proteinverdau

Die weitere Probenvorbereitung, die den Verdau der Proteine beinhaltet, erfolgte gemäß dem iTRAQ<sup>TM</sup>-Reagenzien Protokoll. Die vorgegebenen Volumenangaben im Protokoll bezogen sich auf die Verwendung eines Labels und einer Proteinmenge von 75 µg. Entsprechend musste je nach vorher gemessener Proteinkonzentration ein x-facher Volumenansatz angesetzt werden (Tab. 3-15). Das bei der Wessel-Flügge Fällung erhaltene Pellet wurde in Dissolution Puffer mit Hilfe eines Ultraschallbades in Lösung gebracht. Anschließend wurde mit entsprechenden Puffern und vorgegebenen Inkubationszeiten reduziert und die Cysteine geblockt. Für den Verdau galt ein 1:50 Verhältnis von Trypsin zu Protein. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass Trypsin in einem Volumen von 10 µl für je 75 µg Protein dazugegeben wurde. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C. Anschließend können die generierten Peptide bei -20°C, für eine längere Lagerung bei -70°C, eingefroren werden.

**Tab. 3-15: Mengen für iTRAQ Ansätze**

x-facher Ansatz	2x	3,5x	4x
Proteinmenge	150 µg	260 µg	300 µg
Dissolution-Puffer	40 µl	70 µl	80 µl
Denaturant	2 µl	3,5 µl	4 µl
Reduktions- Reagenz	4 µl	7 µl	8 µl
Cystein-Blocking- Reagenz	2 µl	3,5 µl	4 µl
Trypsin	3 µg	5,38 µg	6,15 µg
In Trypsin Solution ( $\Sigma$ 20 µg/ 130 µl)	20 µl	35 µl	40 µl
$\Sigma$	68 µl	119 µl	136 µl

#### 3.5.4 iTRAQ-MARKIERUNG

Um die aufbereiteten Proben von gesundem und erkranktem Gewebe direkt miteinander zu vergleichen, wurden die Peptide im Arbeitsablauf chemisch markiert [92]. Das Anfügen von sogenannten iTRAQ<sup>TM</sup>-Reportern ermöglichte es, eine relative Quantifizierung durchzuführen. Die Peptide wurden dazu analog zu den Angaben des Herstellers (iTRAQ Reagens Multiplex Kit, #4352135, Applied Biosystem) modifiziert. Der Prozess der Markierung lief bei Raumtemperatur ab. Für die vier parallelen Probeansätze (2 x gesundes Gewebe, 2 x Tumorgewebe) standen vier iTRAQ<sup>TM</sup>-Reagenzien mit unterschiedlich schweren Reportern (114, 115, 116 oder 117 Da) zur Verfügung, die im ersten Schritt mit 70 µl im Kit enthaltenen EtOH gemischt wurden. Die Ausgangsproteinmenge 150 µg erforderte je Probe die Verwendung von zwei gleichen iTRAQ-Labeln. Nach der Zugabe wurden die Peptide mit den iTRAQ-Labeln zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Prozedur durch die Zugabe von 1% Volumen an 200 nM Lysine abgestoppt. In der Vakuumzentrifuge wurden die Proben vereint und eingeeengt.

#### 3.5.5 PEPTIDAUFREINIGUNG

Die Aufreinigung der markierten Peptide erfolgte über die C<sub>18</sub>-Umkehrphasen-Chromatographie (RP). Hierfür wurden die getrockneten Peptide in ca. 100 µl RP-Puffer A resuspendiert. Anhand eines Lackmus-Papierstreifens (pH1-11, Macherey-Nagel) wurde der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls durch tropfenweise Zugabe von TFA-Lösung (1%, 2% oder 10% in ddH<sub>2</sub>O) auf einen pH-Wert zwischen 2 und 3 eingestellt. Als RP-Matrix diente das mit RP-Puffer B aufgeschwämmte LiChroprep RP-18 Material und eine Bakerbond spe<sup>TM</sup>-Leersäule mit unterer Fritte. Die Säule wurde bis auf eine Füllhöhe von

ca. 0.5 cm mit dem RP-18-Material beladen. Anschließend wurde das Material mit RP-Puffer B aktiviert und nachfolgend mit RP-Puffer A äquilibriert (jeweils 5 Waschschrirte mit 500 µl) (Tab. 3-16). Dabei wurden die Puffer mit der Stickstoffanlage langsam durch das RP-18-Material und die Fritte gedrückt, wobei zu beachten war, dass das RP-Material nicht trocken lief. Nach der Aktivierung und Äquilibrierung wurde die markierte Peptidprobe auf die Säule gegeben. Das Ganze wurde mit der Peptidprobe fünfmal wiederholt, um möglichst alle Peptide an das RP-18-Material zu binden. Anschließend wurden die gebundenen Peptide viermal mit Puffer A gewaschen und darauffolgend dreimal mit je 200 µl RP-Puffer B eluiert. Der Überstand und auch die Waschschrirte wurden gesammelt, eingengt und anschließend in 50 µl RP-Puffer A resuspendiert. Mittels Zip-Tip-C18µ-Pipettenspitzen ((#ZTC18M960, Millipore) wurden der Durchlauf und die Waschschrirte auf verbliebende, nichtgebundene Peptide hin überprüft. Dazu wurden die Pipettenspitzen aktiviert, äquilibriert und die möglicherweise gebundenen Peptide eluiert. 1 µl wurde dann zusammen mit 1 µl Matrixlösung auf ein Dünnschicht-Target gegeben und anschließend mittels Maldi (Ultraflex-Tof/Tof, Bruker Daltonics) überprüft. Wenn in den Spektren Peptidionen vorhanden waren, wurde die C<sub>18</sub>-Umkehrphasen-Chromatographie mit dem Durchlauf und den Waschschrirten wiederholt. Die Eluate der Peptidaufreinigung (3 x 200 µl) wurden vereint und bis zur vollständigen Trocknung eingengt.

**Tab. 3-16: Verwendete Puffer zur Peptidaufreinigung**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration	Anmerkung
<b>RP-Puffer A</b>	TFA	0.2% (v/v)	pH 2.5 (2%ige TFA-Lösung)
	ACN	2% (v/v)	
<b>RP-Puffer B</b>	TFA	0.2% (v/v)	pH 2.5 (2%ige TFA-Lösung)
	ACN	60% (v/v)	

### 3.5.6 IMAC ZUR AUFREINIGUNG PHOSPHORYLIERTER PEPTIDE

Um die phosphorylierten Peptide aus der komplexen Peptidmischung zu separieren, wurde die Immobilized-Metal-Affinity-Chromatographie (IMAC, Phosphopeptide Isolation Kit; Pierce; Nr. 89853) verwendet. Die iTRAQ<sup>TM</sup>-markierten Peptide wurden in 50 µl Bindungspuffer durch 5 min Ultraschallbad und 55 min Schüttler bei 30 °C resuspendiert. Die anschließende Isolierung erfolgte über Nacht durch zwei Ga<sup>3+</sup>-Geldisks in einem Sörensen-Eppendorf-Gefäß bei 4°C. Nach der Inkubation wurde die Suspension mittels Bindungspuffer in eine Leersäule überführt und bei 400 x g für eine Minute zentrifugiert. Der Durchlauf wurde aufgefangen. Die Säule wurde 12-mal mit 100 µl Bindungspuffer gewaschen. Anschließend wurden die phosphorylierten Peptide mit 5x mit 200 µl Elutionspuffer eluiert.

Die phosphorylierten Fraktionen, aber auch der Durchlauf und Waschfraktionen (abgereicherte Fraktionen), wurden jeweils eingeeengt, vereinigt und anschließend wie bereits beschrieben mittels einer C<sub>18</sub>-Umkehrphasen-Chromatographie aufgereinigt. Die vereinte Fraktion der phosphorylierten Peptide wurde möglichst zeitnah massenspektrometrisch analysiert.

**Tab. 3-17: Für die Aufreinigung phosphorylierter Peptide benötigte Puffer**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration	Anmerkung
<b>Bindungspuffer</b>	MeOH	27% (v/v)	pH 2.8 (konz. Essigsäure)
	ACN	27% (v/v)	
	Essigsäure (10%)	20% (v/v)	
<b>Elutionspuffer</b>	Ammoniumphosphat	0.1 M	pH 4.5 (Ammoniak)

### 3.5.7 KATIONENAUSTAUSCH-CHROMATOGRAPHIE

Durch Kationenaustausch-Chromatographie wird eine effiziente Analyse der Phosphopeptid-abgereicherten Fraktion in der Massenspektrometrie möglich, da hierbei komplexe Peptidmischungen aufgetrennt werden (Strong Cation Exchange Chromatography, SCX). Dazu wurde die gereinigte und getrocknete Phosphopeptid-abgereicherte Peptidmischung in 42 µl SCX-Puffer A resuspendiert und bei 182 000 xg für 20 min ultrazentrifugiert (Sorvall Discovery<sup>TM</sup> MS120E, Hitachi; Rotor: S100AT3-308).



Zur Fraktionierung wurde der Überstand in ein Ettan-microLC-System eingeschleust. Die Peptide wurden über eine Mono S PC1.6/5-Säule (GE-Healthcare, #17-0672-01) durch einen linearen Gradienten (0%- 35% SCX-Puffer B, 30 min, 150 µl/min Flussrate) aufgetrennt. Die Fraktionsgröße entsprach dem Durchlauf einer Minute. Die Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 214 nm ermöglichte eine genaue Identifizierung der peptidhaltigen Fraktionen.

**Tab. 3-18: Verwendete Puffer für die Kationenaustausch-Chromatographie**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration
<b>SCX-Puffer A</b>	Ameisensäure	0.065% (v/v)
	ACN	25% (v/v)
<b>SCX-Puffer B</b>	Ameisensäure	0.065% (v/v)
	ACN	25% (v/v)
	KCl	0.5 M

### 3.5.8 PEPTID- TRENNUNG UND- FRAGMENTIERUNG

Die Fraktionen aus der SCX wurden getrocknet, in 20 µl RP-Puffer A resuspendiert und mittels ZipTip-C18µ-Pipettenspitzen (Millipore XXX) entsalzt. Sowohl die Phosphopeptid-abgereicherten Fraktionen als auch die Phosphopeptid-haltige Peptid-Fraktion (IMAC-Eluat) wurden nach ihrer Aufreinigung und der anschließenden Vakuum-Trocknung in 6 µl 6% ACN/ 0.2% TFA resuspendiert, auf 13 µl mit 0.2% TFA aufgefüllt und bei 182 000 xg für 20 min ultrazentrifugiert.

Vor der Peptidsequenzierung wurden die Peptide durch ein nano Acquity Ultra Performance LC-System (Waters Corp.) getrennt. Die zu analysierende Probe wurde auf eine C18-Vorsäule (5 µm Symmetry C18, 180 µm x 20 mm, Waters Corp.) gegeben und mit UPLC-Puffer A gewaschen. Die Trennung erfolgte auf der analytischen Säule (nanoACQUITY UPLC BEH C18 Column, 1.7 µm, 75 µm x 250 mm) mit UPLC-Puffer B und einer Flussrate von 350 nl/ml und 30- bis 180-minütigen Gradienten. Das UPLC-System war mit einen Pico-Tip-Emitter (New Objective, Inc.) an das jeweilige Massenspektrometer angeschlossen.

Für Experiment I und II wurde das Massenspektrometer LTQ-Orbitrap-XL (Thermo Scientific) eingesetzt. Die Proben aus Experiment III wurden mit dem Massenspektrometer Orbitrap-Velos (Thermo Scientific) vermessen. Zur Optimierung der Messung von Spektren wurden bei Experiment II und III eine 'Exclusion List' eingeführt (Tab. 3-20).

**Tab. 3-19: Verwendete Puffer zur Peptidtrennung in der nano-UPLC**

Bezeichnung	Zusammensetzung	Konzentration
<b>UPLC-Puffer A</b>	Ameisensäure	0.1% (v/v)
<b>UPLC-Puffer B</b>	Ameisensäure	0.1% (v/v)
	ACN	99.9% (v/v)

**Tab. 3-20: Spezifische MS- und MS/MS-Einstellungen bezüglich der Dynamischer Ausgrenzung („Dynamic exclusion“)**

Parameter	Experiment I	Experiment II	Experiment III
Dynamische Ausgrenzung			
- Anzahl der Wiederholung	1	2	2
- Dauer der Wiederholung	8.00	17.00	17.00
- Größe der Ausschlussliste	200	200	200
- Ausschlussdauer	15.00	90.00	90.00
- Massenbreite des Ausschlusses	Relative to mass	By mass	By mass
~ wenig Breite	(%) 0.00	1.1	1.1
~ hohe Breite	(%) 0.00	1.6	1.6
Anzahl der Abläufe	disabled	2	2
Ablauf S/N Schwelle		2.0	2.0

### 3.5.9 PEPTID-/ PROTEIN- IDENTIFIZIERUNG

Die vom Massenspektrometer aufgezeichneten Rohspektren enthalten Informationen zur Peptidmuttermasse und die innerhalb eines Fragmentionen-Spektrums aufgetretenen Fragmentionen-Massen. Diese werden gegen Mascot (Matrix Science Ltd.), einer Datenbank mit theoretisch bestimmten Massen, geschickt und gegen die aktuelle UniProt-Datenbank abgeglichen.

Die für die Mascot-Suche eingestellten Parameter sind in Tab. 3-21 gekennzeichnet. Für die Proteinidentifizierung wurden nur Rank-1-Peptide (bold red) verwendet. Als Scoring-Verfahren wurde das Standard-Scoring von Mascot eingesetzt, wobei bei der Peptid-Identifizierung für jeden Datensatz eine Signifikanzgrenze von  $p < 0.05$  gesetzt wurde.

**Tab. 3-21: Parameter zur Peptid-/Protein-Identifizierung**

Parameter	LTQ- Orbitrap-XL/ Orbitrap- Velos
Datenbank	Sprot
Taxonomie	Homo sapiens (human)
Protease	Trypsin
Maximale Fehlschnittstelle	1
Fixierte Modifikation	iTRAQ4plex(K), iTRAQ4plex(N-term)
Variable Modifikation	Carbamidomethyl (C), iTRAQ4plex (Y), Methylthio (C), Oxidation (M), Phospho (ST), Phospho (Y)
Precursor Ladung	2+ und 3+
Precursor Toleranz	10 ppm
Fragmentionen Toleranz	0.1 Da
Instrument Typ	ESI-FTICR
Suchtyp	MS/MS-Ionen Suche
Massen-Werte	Monoisotopisch

Durch die Mascot-Datenbanksuche wurden auch die phosphorylierten Peptide ermittelt. Von den regulierten und noch nicht annotierten Phosphorylierungsstellen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Nimtz die korrespondierenden Rohspekten manuell auf Anwesenheit, korrekt zugeordnete Aminosäure und auf Qualität überprüft.

### 3.5.10 REGULATIONSANALYSE

Die Regulationsanalyse gründet sich auf der Verwendung von iTRAQ<sup>TM</sup> zur relativen Quantifizierung. Die iTRAQ Fragment-Ionen finden sich, nach erfolgreichem Markierungsvorgang, in den niederen Massenbereichen jedes generierten Peptidspektrums. Die Intensitäten der iTRAQ-Reporter konnten genutzt werden, um einen statistisch zuverlässigen Regulationsfaktor (RF = das intensitätsabhängige Verhältnis zwischen Reporter 1 und 2 aller logischen Peptidsequenzgruppen) zu berechnen. Dazu wurde die Software iTRAQassist entwickelt, die bereits in mehreren Publikationen verwendet und

beschrieben wurde [83,108]. Als Grundlage der RF- Berechnungen dienten die aus Mascot resultierenden DAT-Datenfiles, welche in iTRAQassist geladen wurden.

Berechnung durch iTRAQassist:

- 1) Korrektur der Verunreinigungen der iTRAQ- Reagenzien durch deren Isotope
  - durch die Anpassung der tatsächlichen Ionenintensitäten
- 2) Abschätzung der Geräte-spezifischen Rauschparameter
- 3) Normalisierung der regulatorischen Information durch Nutzung aller Peptide
  - zur Berechnung ihres Medians um Schwankungen der Proteinkonzentrationen innerhalb der verschiedenen Proben zu kompensieren
- 4) Filterung der Proteine nach Kinasen, die anhand ihrer Zugehörigkeit zur Familie der Kinasen in SwissProt erkannt werden (Swissprot = Uniprot, manually curated)
- 5) Berechnung des wahrscheinlichsten RF für eine Peptidgruppe (beinhaltet mehrfach gemessene identische Peptidsequenz) und für das Gesamtprotein (beinhaltet alle zugehörigen Peptidgruppen)

Der Peptidscore für die Berechnung der Kinasen-RFs wurde auf 30 festgelegt. Für die Bestimmung der Regulation von phosphorylierten Peptiden wurde ein Score von 25 ausgewählt. Das Massendelta für die Reporter betrug 0.02 Da. Die Resultate wurden in einer Excel-Tabelle zusammengefasst und zusätzlich als Likelihood- Kurven abgebildet. Die Breite der Kurve ist dabei ein Indikator für die Zuverlässigkeit des vorgeschlagenen Regulationsfaktors und wird durch den Intervall der Robustheit (‘Interval of Robustness‘, IoR) wiedergegeben. Regulierte Proteine wurden ab einen Faktor von 1.5 als hoch- und unter einen Faktor von -1.5 als negativ reguliert betrachtet.

## 3.6 VERWENDETE SOFTWARE

### 3.6.1 STATISTISCHE UNTERSUCHUNGEN

CLUSTER 3.0 UND TREEVIEW [<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>]

Cluster 3.0 und TreeView sind ursprünglich für die Analyse und Visualisierung von komplexen Mikroarray-Experimenten entwickelt worden. Beide Tools stehen kostenlos als Download zur Verfügung. Cluster 3.0 enthält eine Reihe von Varianten der Clusteranalyse u.a. hierarchisches oder k-means Clustern [109]. Es ist aber möglich, die eigenen (log2)- Regulationsdaten der Kinasen in einem Textdokument zu speichern, durch Cluster 3.0

analysieren und durch TreeView visualisieren zu lassen. Das dabei mit Cluster 3.0 erzeugte .cdt Format kann in Treeview geladen werden. Treeview diente in dieser Arbeit zur Visualisierung der Daten, da alle sechs Kinase-Regulationsprofile nebeneinander betrachtet werden konnten. Zudem wurde mit dieser Software die Heatmap der regulierten Kinasen erstellt (Abb. 4-17).

### CLUSTER ANALYSE

Das Ziel einer Clusteranalyse ist es, die einzelnen Proben auf Grund ihrer Ähnlichkeit bzw. Verwandtschaftsgrade zusammenzufassen. Das Clustern der Proben erfolgte in dieser Arbeit mittels hierarchischem Clustern auf der Basis der quadratischen euklidischen Abstände (Summe der quadratischen Differenzen) der (log2)-Regulationsfaktoren der Kinasen. Je näher die Proben miteinander verwandt waren, desto früher werden sie in einem Cluster zusammengefasst. Dafür wurde der Abstand zwischen den Clustern nach dem Ward-Verfahren berechnet.

### PEARSON KORRELATIONSKOEFFIZIENT

Der Korrelationskoeffizient wurde zusätzlich zur Clusteranalyse ermittelt und stellt ein Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Proben dar. Die Werte können zwischen -1 und +1 schwanken, wobei bei 1 ein vollständig positiver linearer Zusammenhang zwischen den Proben vorliegt. Ab einem Wert von 0.5 geht man von einer Korrelation zwischen zwei miteinander analysierte Proben aus.

### BOXPLOT (Abb. 4-14 B):

Für die Boxplots wurden die (log2)-Regulationsfaktoren der Kinasen verwendet. Ein Boxplot dient zur graphischen Darstellung der Verteilung der Daten und somit für einen ersten Überblick. Die Länge der Box entspricht dem Interquartilsabstand. Dieser Wertebereich beinhaltet die mittleren 50% aller Messwerte. Innerhalb dieser Box wird der Median aller Daten als durchgehender Strich eingezeichnet. Die Antennen umfassen die Werten die innerhalb der 1.5-fachen Länge dieser Box liegen.

Die Clusteranalyse, der Boxplot und die Korrelationswerte wurden durch den Mathematiker Prof. Frank Klawonn erstellt bzw. ermittelt.

### 3.6.2 WEITERE SOFTWARE

DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)

DAVID ist eine Datenbank zur Annotation, Visualisierung und der integrierte Entdeckung (,Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery,) der eingegebenen Daten. Es handelt sich um eine web-basierte Software, die aber kostenfrei zur Verfügung steht. DAVID ordnet die eingegebenen Proteine funktionell ein, u.a. in Erkrankungen, Gen Ontologie, Signalwege (u.a. KEGG-, Panther und Biocarta-Datenbank) und Protein-Interaktionen.

GENEGO (<http://www.genego.com/>)

Genego ist eine kostenpflichtige, systembiologische Analysesoftware. Diese Software kann für die funktionelle Auswertung der experimentellen Ergebnisse verwendet werden. Es unterstützt die Suche nach veränderten Signalwegen und Netzwerke, beteiligten Transkriptionsfaktoren und vorhandenen Proteininteraktionen, sowie bereits vorhandenen Medikamenten aufbauend auf den eigenen Daten.

PHOSPHOSITEPLUS (<http://www.phosphosite.org>)

PhosphoSitePlus.org ist eine Internetseite, die sich mit PTMs und speziell mit Phosphorylierungen an Proteinen befasst und dazu sehr umfassende Informationen liefert. Dabei werden bereits bekannte Phosphorylierungsstellen eines Proteins angezeigt, die Referenzen und, wenn bereits beschrieben, die funktionellen Aspekte.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 EXPERIMENTELLE STRATEGIE

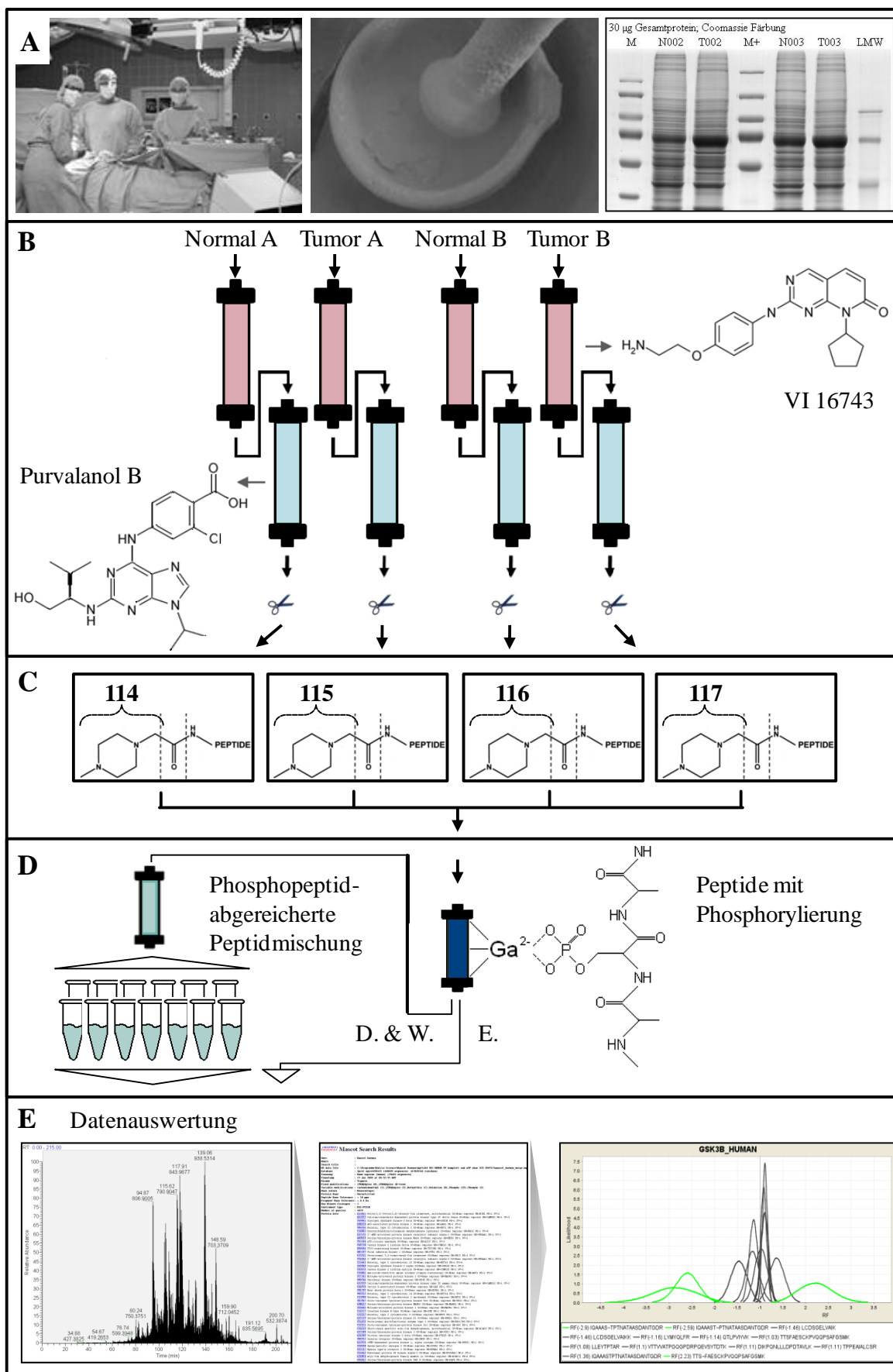
#### **Strategie zur Bestimmung deregulierter Kinasen im ex-vivo Gewebematerial an Nierenzellkarzinom-erkrankten Patienten**

Der Begriff ‚humanes Kinom‘ beschreibt die Summe aller Kinasen einer menschlichen Zelle. Kinasen sind essentielle Komponenten der Signaltransduktion und verantwortlich für posttranslationale Proteinphosphorylierung. Deregulierte Kinasen können daher den Ablauf wichtiger zellulärer Prozesse verändern und an der Entstehung von Krebserkrankungen beteiligt sein. Ein detailliertes Verständnis der molekularen Mechanismen dieser Signalmoleküle wird nicht nur für die Grundlagenforschung benötigt. Regulierte Kinasen stellen zunehmend ein attraktives Ziel in der Arzneimittelforschung dar.

In den letzten Jahren wurde von der Arbeitsgruppe ‚zelluläre Proteomik‘ am HZI eine experimentelle Strategie zur erfolgreichen quantitativen Analyse des Phosphokinoms entwickelt. Dabei lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der InlB- und HGF/SF-aktivierten c-Met Signalkette in HeLa S3 und DU-145 Zelllinien [83], sowie auf dem Vergleich differenzieller, primärer Zellpopulationen [110]. Ausgangspunkt beider Studien bildete die kinase-selektive Affinitätschromatographie, basierend auf immobilisierten niedermolekularen Kinaseinhibitoren.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist die Überprüfung der Anwendbarkeit und die Optimierung des bisherigen experimentellen Arbeitsablaufes zur Anreicherung und Charakterisierung von Kinasen und deren Phosphorylierungsereignissen aus *ex-vivo* Gewebe. Dafür wurden Tumor- und korrespondierendes gesundes Gewebe parallel und vergleichend proteomisch analysiert. Dadurch entstand erstmalig die Möglichkeit, für jeden Patienten individuell Kinasen und Phosphorylierungen zu identifizieren, diese zu quantifizieren und in den Zusammenhang mit Krebs-assoziierten Ereignissen zu bringen.

Der Versuchsablauf (Abb. 4-1) besteht aus mehreren Versuchsschritten, die in ihrer Kombination eine umfangreiche proteomische Studie der Kinasen und deren Phosphorylierungen beim Nierenzellkrebs ermöglichten.





**Abb. 4-1: Experimentelles Design zur quantitativen Analyse von Proteinkinasen und Phosphorylierungen aus ex-vivo Gewebe.** (A) *Ex-vivo* Tumorgewebe und korrespondierendes gesundes Gewebe werden unter flüssigem Stickstoff gemörst und mit Lyispuffer versetzt, um Gesamtproteom zu extrahieren. (B) Anschließend werden über die immobilisierten Kinaseinhibitoren V16743 und Purvalanol Kinasen angereichert und im nächsten Schritt verdaut. (C) Die Peptide werden differenziell mit iTRAQ für quantitative Untersuchungen markiert. Durch die Verwendung dieser Reagenzien können die Peptide kombiniert analysiert werden. (D, rechts). Phosphorylierte Peptide werden über  $\text{Ga}^{3+}$ -IMAC angereichert, um sie effizienter zu ionisieren und im Folgenden zu sequenzieren. (D, links) Nicht-phosphorylierte Peptide werden über SCX dekomplexiert und anschließend genauso wie die phosphorylierten Peptiden (E) über LC-MS/MS getrennt und fragmentiert. Die Peptidsequenzierung aller generierten MS/MS-Spektren erfolgt durch MASCOT gegen die humane Swissprot-Datenbank. Abschließend werden die quantitativen Daten durch iTRAQassist statistisch evaluiert. D: Durchlauf, W: Waschschritte, E: Eluat.

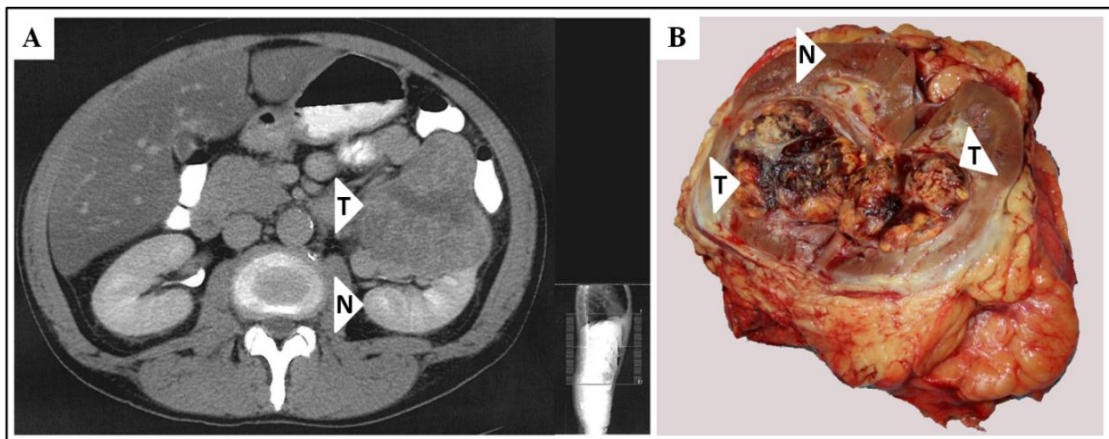
Der Versuchsablauf besteht aus folgenden bioanalytischen Schritten:

- Extraktion des Gesamtproteoms aus Tumorgewebe und korrespondierendem, gesunden Nierenparenchym. Die Gewebeproben zweier Patienten wurden vorzugsweise parallel aufbereitet. Die resultierenden vier Proteome wurden in den weiteren Schritten vergleichend analysiert.
- Kinase-selektive Affinitäts-Chromatographie zur Anreicherung der Kinasen und anschließender tryptischer Verdau der angereicherten Proteine zu Peptiden.
- Chemische Markierung der generierten Peptide (iTRAQ<sup>TM</sup>). Dieser Vorgang ermöglichte eine Kombination der verschiedenen Proben und deren relative Quantifizierung.
- Anreicherung und Analyse der phosphorylierten Peptide aus dem komplexen Peptidgemisch. Die verwendete Affinitätschromatographie beruhte auf immobilisierten Gallium-Ionen.
- Fraktionierung des komplexen, nicht-phosphorylierten Peptidgemisches über SCX.
- Multidimensionale Peptidtrennung und -fragmentierung, sowohl der Phosphopeptid-abereicherten als auch -angereicherten Fraktionen.
- Datenauswertung, wobei die Peptide identifiziert, quantifiziert und die Phosphorylierungsstellen zugeordnet wurden.

## 4.2 DAS NIERENZELLKARZINOM: AUSWAHL UND CHARAKTERISIERUNG

Die experimentelle Strategie und die Umsetzung wurden anhand der menschlichen Niere und deren häufigste Krebsform, dem Nierenzellkarzinom, als Gewebegrundlage geplant und durchgeführt. Das Gewebe der Niere ist infolge seiner differenziellen Funktionen sehr komplex, eignet sich jedoch aus mehreren Gründen für quantitative Proteomstudien:

- Die Nephrektomie, eine operative Entfernung der gesamten betroffenen Niere inklusive Tumor, ist nur bei entsprechend großen Tumoren (Abb. 4-2 A) bzw. bei bereits metastasierten Tumoren notwendig. Dadurch war eine Entnahme von mindestens zwei Milligramm Tumormaterial möglich, um für die Aufreinigung von Kinasen die nötige Proteinmenge extrahieren zu können.
- Desweiteren wurde bei der erkrankten Niere neben dem Tumorgewebe auch das gesunde, umliegende Nierenparenchym operativ entfernt. Wie die Abb. 4-2 4-2 B verdeutlicht, handelt es sich bei dem Nierenzellkarzinom um einen zum Nierenparenchym hin meist gut unterscheidbaren und abgegrenzten Tumor.
- Auf Grund der Chemoresistenz des Nierenzellkarzinoms sind Therapieansätze, welche die Anwendung von Kinaseninhibitoren beinhalten, bereits im Einsatz und weiterhin von großem Interesse. Ein Kinase-Screening des Nierenzellkarzinoms könnte einen tieferen Einblick in Kinase-abhängige Signalwege liefern.



**Abb. 4-2: Aufnahmen eines Nierenzellkarzinoms.** (A) Computertomographische Aufnahme des Patienten 002 mit einem Nierenzellkarzinom in der rechten Niere. (B) Aufnahme der entnommenen Niere mit Tumorgewebe des Patienten 007 im Längsschnitt; neben der Größe des Tumors wird die Abgrenzung zum Nierenparenchym deutlich. N: gesundes Nierenparenchym; T: Tumorgewebe

#### 4.2.1 DIE ENTNAHME UND AUSWAHL DER UNTERSUCHTEN NIERENZELLKARZINOME

Die Klinik für Urologie des Klinikum Braunschweig (Kooperation Chefarzt Prof. Dr. Peter Hammerer, Assistenzärztin Kathrin Haberecht) ermöglichte die Gewebeentnahme direkt im Operationssaal und gewährleistete damit eine sofortige Lagerung auf mitgeführtem Trockeneis. Insgesamt wurden 12 Nephrektomien begleitet. Die Nieren wurden direkt nach der Nephrektomie seitlich aufgeschnitten. Sowohl vom Tumor als auch von dem Nierenparenchym wurden aus jeweils zwei verschiedenen Bereichen Gewebematerial entnommen. Die Bereiche des gesunden Gewebes wurden in größerer Entfernung zum Tumor gewählt, was zum einen den Einfluss tumorassoziierter Wachstumsfaktoren auf das gesunde Gewebe minimiert und zum anderen eine Verletzung der Übergänge vom kranken zum gesunden Gewebe vermied. Zudem wurde die nachfolgende Bewertung der Infiltration des Tumors in das umliegende Nierengewebe durch die Pathologie des Klinikums Braunschweig nicht beeinflusst. Die nachgelieferten, pathologischen Befunde der Tumoren lieferten Informationen zum Typ des Karzinoms, der Größe und des Gewichts, sowie dem Differenzierungsgrad und der TNM-Klassifizierung.

Unter Berücksichtigung einer möglichst kurzen Zeitspanne zwischen Entnahme der Niere und der Lagerung auf dem mitgeführten Trockeneis wurde Gewebematerial von insgesamt sieben der zwölf Patienten für die quantitativen Analysen ausgewählt. Probenmaterial, das nach der operativen Entnahme nicht innerhalb von 10 min auf Trockeneis gelagert werden konnte, wurde für die nachfolgenden Analysen nicht weiter berücksichtigt. Bei den sieben Patienten, deren Nierengewebe verwendet wurde, handelte es sich sowohl um weibliche als auch männliche Patienten im Alter von 39 bis 86 Jahren. Die Auswahl und die Charakterisierung der Nierenzellkarzinome werden in Tabelle 4-1 aufgeführt. Das Gewebematerial von Patient 001 wurde für einen Vorversuch genutzt, um die Arbeitsschritte erstmalig aufeinanderfolgend durchzuführen und die Praktikabilität anhand der erlangten Ergebnisse einzuschätzen. Zusätzlich diente der Vorversuch der gezielten Anpassung analytischer Parameter. Die Resultate wurden abweichend vom später verwendeten Standardprotokoll erzielt und wurden daher nicht in die Studienauswertung einbezogen. Für die erste repräsentative, proteomische Studie wurden die Gewebeproben der Patienten 002 und 003 verwendet. Zu Beginn der Gewebeaufbereitung lagen noch keine pathologischen Befunde vor, weshalb erst im späteren Verlauf deutlich wurde, dass es sich hierbei um zwei unterschiedliche Nierenzellkarzinom-Subtypen handelte. Der Patient 003 erkrankte an einem chromophoben Tumor, welcher mit 5% äußerst selten

vorkommt und bis zum Abschluss der praktischen Untersuchungen einmalig blieb. Sowohl das Tumorgewebe von Patient 002, als auch die Gewebeproben des zweiten (Patienten 004 und 007) und dritten proteomischen Ansatzes (Patienten 008 und 011) gehörten zum klarzelligen Nierenzellkarzinom und wurden mit gesundem Nierenparenchym des jeweiligen Patienten vergleichend analysiert. Die Nierenzellkarzinome wurden so ausgewählt, dass in dieser Arbeit ein Querschnitt über die Stadien hinweg erhalten wurde. Zur Unterscheidung der untersuchten Tumoren wurde eine Charakterisierung der Tumorstadien anhand des pTNM Systems, gemäß der WHO Klassifizierung, einbezogen und zusätzlich der Differenzierungsgrad hinzugefügt (vgl. Abschnitt 1.2.3, Anatomische Faktoren) [11,12]. Die Tumoren der Patienten 002 und 011 wurden in Stadium II entdeckt und operativ entfernt. Bei den Patienten 004 und 007 handelte es sich um Tumoren aus Stadium III bzw. IV. Der Tumor von Patient 008 wurde ebenfalls in Stadium IV eingeordnet und hatte im Vergleich zum Tumor des Patienten 007 bereits stark gestreut. Zusätzlich zeichnete sich der Tumor 008 durch einen höheren Differenzierungsgrad aus. Damit kennzeichneten sich die untersuchten Tumoren durch unterschiedliche Größe, Ausdehnung, Infiltration ins umliegende Gewebe, Metastasierung und Differenzierung.

**Tab. 4-1: Pathologische Charakterisierung der für die Experimente ausgewählten Proben**

Studie	Patient Nr.	RCC-Karzinomtyp	TNM Klassifizierung	Stadium	Grad
Vorversuch	001	klarzellig	pT2	II	2
I	002	klarzellig	pT2	II	2
	003	chromophob	pT2	II	2
II	004	klarzellig	pT3a	III	2
	007	klarzellig	pT3b pM1 (OSS)*	IV	2
III	008	klarzellig	pT4 M1 <sup>#</sup>	IV	2-3
	011	klarzellig	pT2	II	2

\* ossäre Metastase im HWK (Halswirbelkörper) 5,  
<sup>#</sup> Metastasen in Lunge, Pleura, Mediastinum und Rückenmark

#### 4.2.2 EXTRAKTION UND CHARAKTERISIERUNG DES PROTEOMS AUS DEM GEWEBE

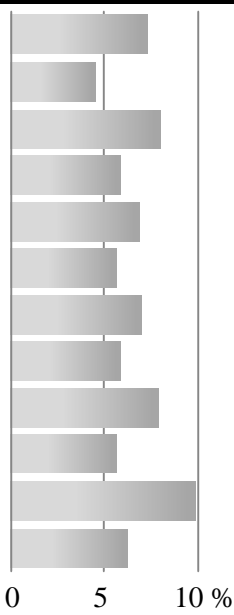
Nach Auswahl der Gewebeproben beinhaltete der nächste Schritt die Extraktion des Gesamtproteoms. Dazu wurde das Gewebe mechanisch unter flüssigem Stickstoff zerkleinert und anschließend mit Lysispuffer versetzt. Vom Tumorgewebe musste im

Vergleich zum gesunden Nierenparenchym mehr Ausgangsmaterial eingesetzt werden, um die gleiche Proteinmenge zu isolieren (Tab. 4-2). Bei der ersten Studie mit Proben der Patienten 002 und 003 wurde zwischen 30 – 40% mehr Ausgangsmaterial vom Tumorgewebe benötigt, um vergleichbare Mengen an Protein zu erhalten. Daher wurden in den nachfolgenden Analysen mit Gewebematerial der Patienten 004, 007, 008 und 011 zwischen 1740 und 2135 mg vom Tumor und zwischen 944 bis 1391 mg gesunden Materials gemörsert. Am Verhältnis von Gewebe- zu Proteinmenge zeigt sich, dass bei den Patienten 004 und 007 (Studie II) theoretisch 20% mehr Ausgangsgewebe vom Tumor für die gleiche Gesamtproteinmenge ausgereicht hätten.

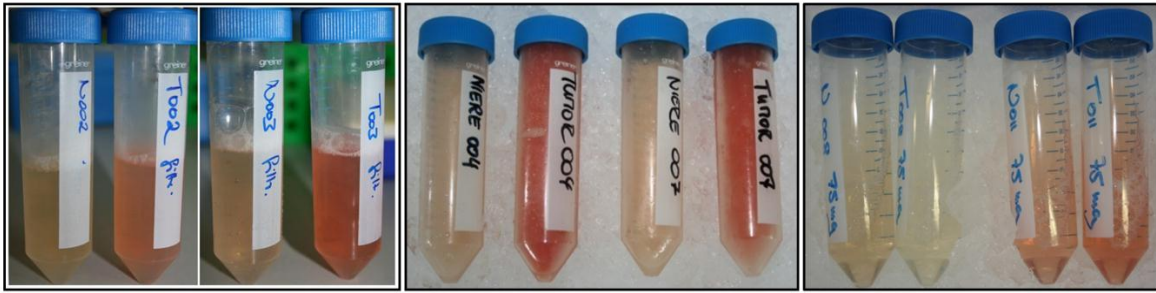
Für die Weiterverarbeitung des extrahierten Proteoms wurde die Proteinmenge bzw. Proteinkonzentration der Tumorprobe und der korrespondierenden Nierenprobe angepasst.

**Tab. 4-2: Verwendete Gewebemenge und extrahierten Gesamtproteinmenge**

Patient Nr.	Gewebe	Gewebe-menge [mg]	Proteinkonz. [mg/ml]	In x ml	Gesamt-protein [mg]	Verhältnis Gewebe-/Proteinmenge [%]
002	Niere	1188	3.477	25	86.9	
002	Tumor	2025	3.719	25	93.0	
003	Niere	566	1.807	25	45.2	
003	Tumor	1094	2.584	25	64.6	
004	Niere	944	2.155	30	64.7	
004	Tumor	1882	3.516	30	105.5	
007	Niere	1288	2.994	30	89.9	
007	Tumor	1740	3.367	30	101.0	
008	Niere	1391	3.645	30	109.4	
008	Tumor	1918	3.607	30	108.2	
011	Niere	1114	3.681	30	110.4	
011	Tumor	2135	4.472	30	134.2	



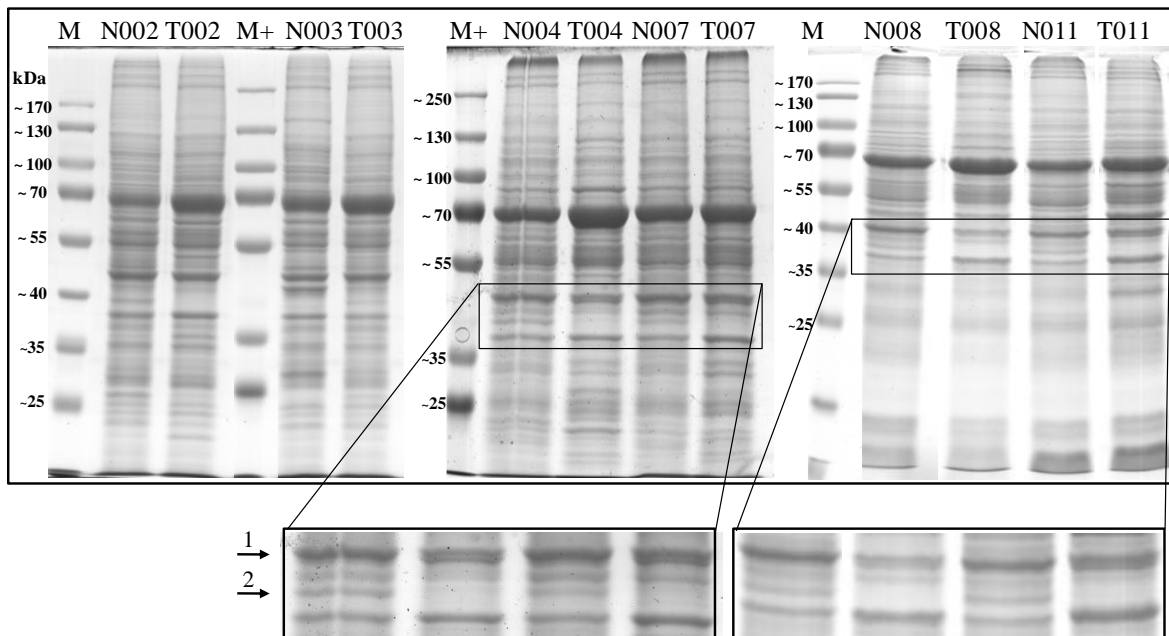
Nach Anpassung der Proteinkonzentration blieb die rötliche Färbung der Tumorgewebe-Lysate erhalten (Abb. 4-3). Die Ursache dafür liegt bei den deregulierten Signalwegen der Tumorzelle, die eine verstärkte Neubildung von Gefäßstrukturen im Gewebe auslösen (Abschnitt 1.3.3). Inwiefern dennoch die Proteinmenge bzw. -konzentration zwischen den Geweben vergleichbar ist, wurde mit einer 1D-Gelelektrophorese überprüft (Abb. 4-4). Anhand der Gelelektrophorese wurde deutlich, dass die makroskopischen Veränderungen der Lysate, bezogen auf die Verfärbung, vernachlässigt werden konnten.



**Abb. 4-3: Makroskopische Veränderung der Gewebelysate.** Nach der mechanischen Zerkleinerung der Gewebeproben wurde Lysispuffer hinzugegeben. Die Lysate von Tumor- und Nierengewebe eines Patienten wurden auf die gleiche Proteinkonzentration angepasst. Auffällig blieb die rötliche Verfärbung der Lysate der erkrankten Gewebe, bedingt durch die Neubildung von Blutgefäßstrukturen.

30  $\mu$ g des Gesamtproteoms wurden auf das SDS-Gel aufgetragen und wiesen nach der Coomassiefärbung ein hochreproduzierbares Bandenmuster auf. Die Banden trennen sich klar voneinander ab und ließen eine gleichmäßige Verteilung der Proteine über den gesamten Massenbereich erkennen. Das deutet darauf hin, dass die zum Lysispuffer hinzugegebenen Proteaseinhibitoren eine Degradation der Proteine effektiv verhinderten.

Darüber hinaus waren die Bandenintensitäten von gesundem und erkranktem Gewebelysat durch die Anpassung der Proteinkonzentration miteinander vergleichbar. Somit konnte für die weiterführenden Analysen auf gleiche Proteinmengen zurückgegriffen werden.



**Abb. 4-4: Gesamtzelllysat aller analysierten Gewebeproben.** Dabei wurden jeweils 30  $\mu$ g Lysat der parallel aufbereiteten Gewebeproben nebeneinander aufgetragen und mittels 1D-Gelelektrophorese im SDS-Gel (12%iges Gel) aufgetrennt. Die Banden zeigten, dass gesundes (N) und erkranktes (T) Gewebe bezüglich der Proteinmenge miteinander vergleichbar sind. Zusätzlich wurde ein Bereich des Geles (35 – 40 kDa) hervorgehoben, der die Konsistenz der Proteinmuster dokumentiert. Markierung 1 zeigt bei dem Tumorgewebe (T) eine kleine Doppelbande auf. Bande 2 erscheint im gesunden Gewebe (N) und fehlt im Tumor.

M = PageRuler™ Prestained Protein Ladder, M+ = PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas)

#### 4.3 AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHISCHE ANREICHERUNG DES NIEREN-PHOSPHO-KINOMS

Wesentliche Voraussetzung für die umfassende Charakterisierung von Kinasen und deren Phosphorylierungen durch massenspektrometrische Methoden war die gezielte Voranreicherung durch spezielle Affinitätschromatographien. Für die niedrig-exprimierten Kinasen wurden immobilisierte Kinaseinhibitoren mit ATP-kompetitiven Bindungseigenschaften eingesetzt. Für eine bessere Detektion der Phosphorylierungen wurden die in einem komplexen Peptidgemisch unterrepräsentierten phosphorylierten Peptide durch IMAC isoliert.

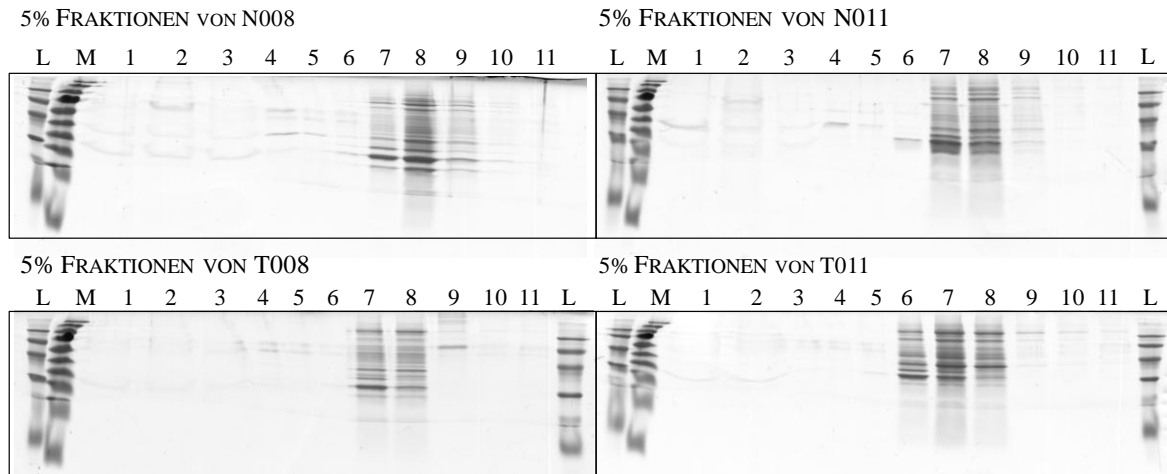
##### 4.3.1 KINASE-SELEKTIVE AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Aus den Gewebelysaten wurden im nächsten Schritt die Kinasen mittels chemischer Proteomik angereichert. Dabei wurde eine Affinitätschromatographie eingesetzt, die auf immobilisierten niedermolekularen ATP-kompetitiven Kinaseninhibitoren basiert. Die Kinasen wurden über ihre konservierte ATP-Bindungsregion [111] angereichert und anschließend durch Peptidsequenzierung mittels Massenspektrometrie identifiziert. Das Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten Studien war eine möglichst umfassende Anreicherung und Charakterisierung humaner Proteinkinasen aus *ex-vivo* Gewebe.

##### **Anreicherung über ATP-kompetitive Inhibitoren**

Während in der Medizin Kinaseinhibitoren, wie Imatinib, gezielt gegen Kinasen eingesetzt werden, verwendet die Grundlagenforschung ATP-kompetitive Inhibitoren, die eine unspezifische aber selektiv gegen Kinasen gerichtete Bindung aufweisen. Eine möglichst umfassende Analyse von Kinasen wurde bei diesen Studien mit den beiden immobilisierten Kinasentyp-unspezifischen Inhibitoren V16743 und Purvalanol B erreicht.

Die Gewebelysate wurden auf die Trennsäulen der Affinitätschromatographie gegeben. Die an den immobilisierten Kinase-Inhibitoren gebundenen Proteine wurden anschließend eluiert. Für eine nachfolgende Markierung mit iTRAQ-Reagenzien war es notwendig die Proteinmenge der Kinase-angereicherten Elution zu bestimmen. Hierzu wurde das Eluat in 11 Fraktionen aufgefangen und davon wurden jeweils 5% für eine Gelelektrophorese mit einem LWM Marker verwendet (Abb. 4-5). Anhand der vom LMW Marker bekannten Konzentration wurde die Proteinmenge mit dem Bildbearbeitungsprogramm AIDA bestimmt und für den nachfolgenden Ablauf angepasst.



**Abb. 4-5: Bestimmung der Proteinmenge der Kinase-angereicherten Fraktionen mittels SDS-PAGE und LWM-Marker (L).** Der Marker wurde dabei in bekannter Konzentration eingesetzt und diente somit als Referenz. Der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (M) wurde als Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Die an den immobilisierten Kinaseinhibitoren verbliebenen Proteine wurden mittels Elutionspuffer (0.5% SDS, 1 mM DTT) bei einer Flussrate von 6 ml/h eluiert und in insgesamt 11 Fraktionen aufgefangen, hier am Beispiel der Tumor- und Nierenparenchymproben der Patienten 008 und 011. Es wurden jeweils 5% jeder Fraktion ca. 2 cm ins SDS-Gel (12%iges Gel) laufen gelassen und mit Coomassie-Blue gefärbt, um anschließend mittels LMW Marker die Proteinmenge zu bestimmen.

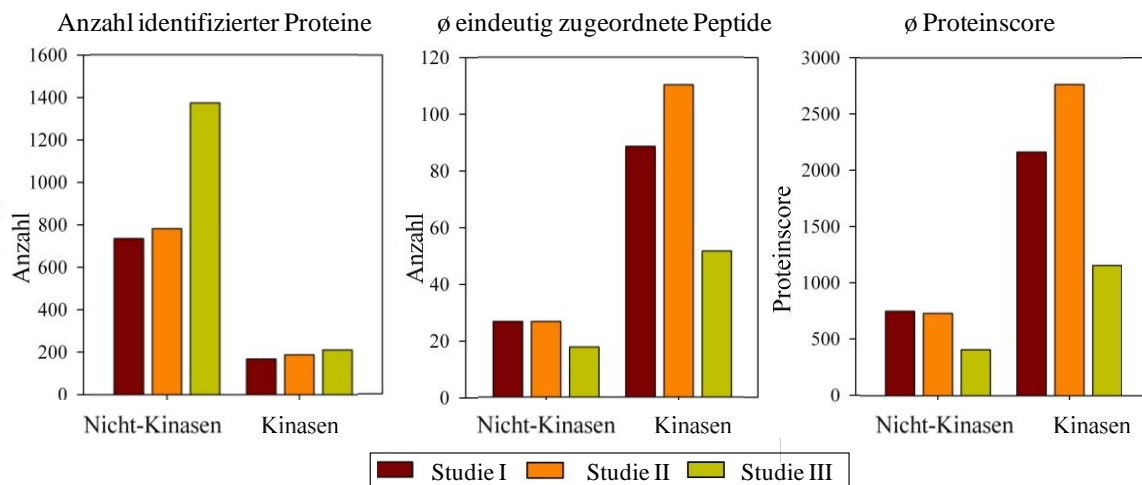
### Anreicherungs-effizienz und -qualität

Nach der spezifischen Bindung und anschließender Elution wurden die Kinasen mittels Peptidsequenzierung identifiziert. Zu diesem Zweck wurden die angereicherten und eluierten Proteine tryptisch verdaut. Das dadurch generierte komplexe Peptidgemisch wurde mittels SXC fraktioniert, um die Effizienz der Peptidsequenzierung in der nachfolgenden massenspektrometrischen Analyse zu erhöhen. Die Fragmentierung der Peptide jeder einzelnen SCX-Fraktion erfolgte nach Elektrospray-Ionisierung für die Studien I und II in der LTQ-Orbitrap-XL. Im Verlauf der Arbeit wurde das Massenspektrometer ausgetauscht, so dass die Proben des dritten proteomischen Ansatzes mit der sensitiveren Orbitrap-Velos gemessen wurden. Die in einem MS/MS-Spektrum enthaltene Peptid-Muttermasse und die Massen der zugehörigen Fragmentionen wurden mit den theoretisch ermittelten Massen in der Swissprot-Datenbank abgeglichen. Dadurch ließ sich das Peptid eindeutig identifizieren und einem bestimmten Protein zuordnen.

Der Einfluss der verwendeten Massenspektrometer wird in der Auswertung der identifizierten Proteine deutlich (Abb. 4-6). Auf Grund der höheren Sensitivität der Velos war der Anteil identifizierter Proteine in Studie III gegenüber den ersten beiden Studien um 40% höher. Der größte Anteil der erstmalig gemessenen Proteine wurde jedoch nur mit einem oder sehr wenigen Peptiden identifiziert. Dies verringerte zwar den mittleren Score (Qualität) aller Proteinidentifizierungen in der letzten Studie, verdeutlicht aber



insbesondere, dass diese Proteine eher als unspezifisch gebundener Anteil innerhalb der Kinasefraktionen durch eine besonders empfindliche Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnten. Qualitativ blieb der Einfluss auf die Kinomanalysen also eher gering. In allen drei Studien wurden die Kinasen im Vergleich zu den restlichen Proteinen mit ungefähr dreimal so vielen Peptiden und einem deutlich höheren durchschnittlichen Proteinscore identifiziert. Diese Ergebnisse verdeutlichen die spezifische Anreicherung von Kinasen aus humanen *ex-vivo* Gewebe unter Verwendung der immobilisierten Kinaseinhibitoren V16743 und Purvalonol B.

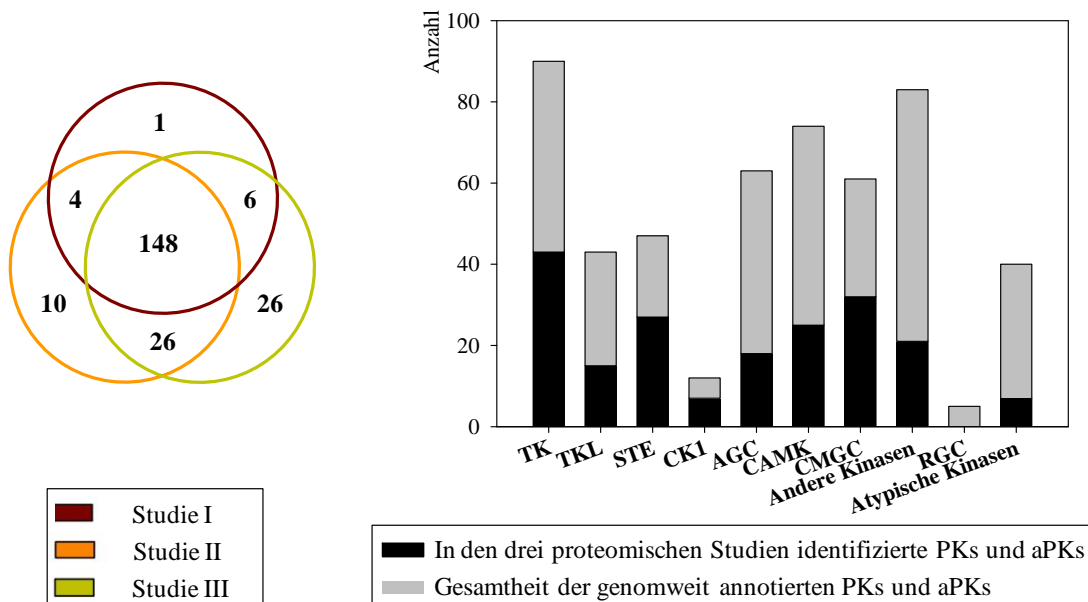


**Abb. 4-6: Anreicherungs-effizienz der Kinase-selektiven Affinitätschromatographie.** Gegenübergestellt wird die Anzahl der identifizierten Proteine mit und ohne Kinasefunktion. Links: Anzahl identifizierter Proteine: Im Durchschnitt wurden ein Fünftel der identifizierten Proteine den Kinasen zugeordnet. Die größte Anzahl identifizierter Kinasen bzw. Proteine wurde in der Studie III detektiert und identifiziert. Mitte/Rechts: In allen drei Studien wurden die Kinasen mit einem durchschnittlich besseren Proteinscore und einer höheren Anzahl zugehöriger Peptide identifiziert als Proteine ohne Kinasefunktion. In der dritten Studie wurden durch die erhöhte Sensitivität der Orbitrap Velos zusätzliche Proteine identifiziert, die aber jeweils nur durch sehr wenige Peptide nachgewiesen wurden.

In der vorliegenden Promotionsarbeit war es durch die affinitätschromatographische Kinase-Anreicherung möglich, die Expression von 221 Kinasen im Nierenzellkarzinom nachzuweisen (Anhang Tab.7-1). 148 Kinasen wurden reproduzierbar in allen drei Studien durch die massenspektrometrische Sequenzierung identifiziert (Abb. 4-7 A). Durch mindestens zwei der drei Experimente wurde eine Abdeckung von 83% aller identifizierten Kinasen erlangt. Mit 188 Kinasen bildet die Familie der Proteinkinasen (PKs) den größten Anteil der isolierten Kinasen. Von drei PKs, darunter Caseinkinase II, Phosphorylase B Kinase und 5'-AMP-aktivierte Proteinkinase, wurden zudem nicht nur die am Kinaseinhibitor bindenden katalytische Einheiten gefunden und aufgelistet, sondern auch die zu einem funktionellen Komplex benötigten regulatorischen Untereinheiten (UE; n=8). Durch Manning und Kollegen wurden genomweit 478 PKs identifiziert und einer von neun

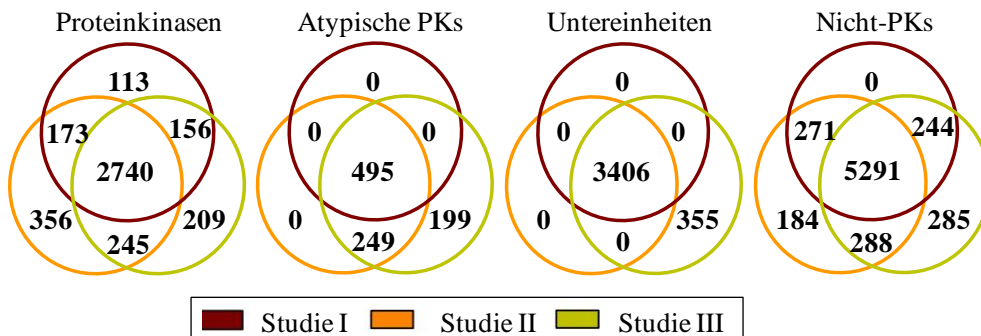
Familien-Gruppen zugeordnet [36]. Das bedeutet, dass in dieser Studie über 39% der gesamten PKs isoliert und analysiert worden sind (Abb. 4-7 B). Bei den Gruppen AGC, CAMK, TKL und ‚anderen PKs‘ wurde eine durchschnittliche Abdeckung von 30% erreicht. Bei vier Gruppen (TK, CMGC, CK1, STE) wurden sogar über 50% der dazugehörigen PKs angereichert. Das zeigt die unspezifische aber selektiv gegen Kinasen gerichtete Bindung, denn zu fast allen Gruppen konnten Proteinkinasen zugeordnet werden. Eine weitere Einteilung der PKs wurde anhand der Akzeptor-Aminosäure vorgenommen. 134 Serin/Threonin-Proteinkinasen (Ser/Thr-PKs) und 44 Tyrosin-Kinasen (Tyr-PKs) wurden identifiziert. 10 Proteinkinasen agieren sowohl als Ser/Thr-PKs als auch als Tyr-PKs.

In dieser Arbeit wurden zudem 7 der 40 beschriebenen atypischen Kinasen (aPKs) gefunden, die sich zwar durch eine biologische Aktivität kennzeichnen, aber keine funktionsfähige Kinasedomäne aufweisen. Möglicherweise beeinträchtigte diese Eigenschaft das Bindungsverhalten zu den ATP-kompetitiven Inhibitoren, da die aPKs mit dem niedrigsten mittleren Proteinscore detektiert wurden (Abb. 4-8). Neben PKs und aPKs wurden 18 Kinasen identifiziert, die, anstelle von Proteinen, niedermolekulare Substrate phosphorylieren und damit als metabolische bzw. Nicht-Proteinkinasen (Nicht- PKs) Teil eines komplexen Stoffwechsels sind.



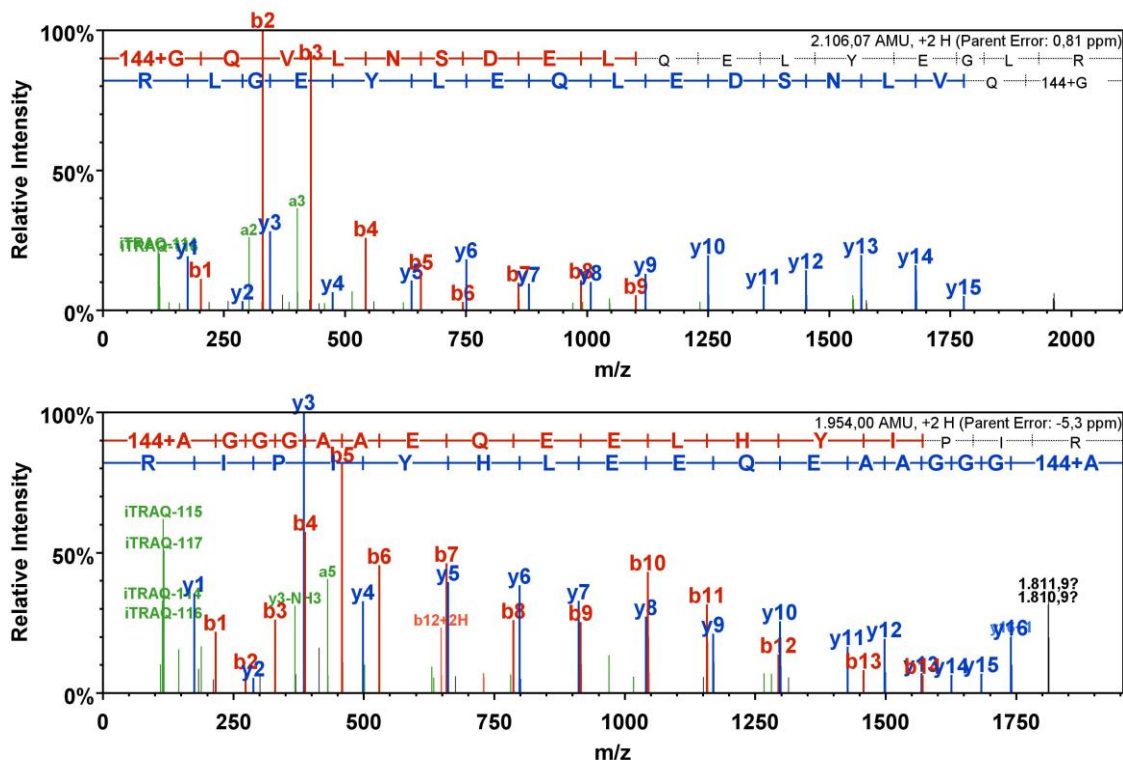
**Abb. 4-7: Einordnung der identifizierten Kinasen.** (A) Gezeigt wird die Verteilung der identifizierten Kinasen in den drei proteomischen Analysen. 148 Kinasen wurden in allen drei Studien und über 80% in mind. zwei Studien reproduzierbar gefunden. (B) Verteilung der identifizierten Kinasen in die Gruppen der genomweit annotierten Kinasen nach Manning et al. [36]. Bis auf die Gruppe RGC konnten zu allen Gruppen Proteinkinasen isoliert und identifiziert werden.

Nicht-PKs hatten wie die PKs einen hohen mittleren Proteinscore, welcher vor allem durch Kinasen erreicht wurde, die reproduzierbar in drei Studien identifiziert wurden (Abb. 4-8).



**Abb. 4-8: Mittlerer Proteinscore der verschiedenen Kinasegruppen** (PKs, aPKs, UE, Nicht-PKs). Den niedrigsten Proteinscore innerhalb der Kinasegruppen hatten die aPKs. Unabhängig von den Gruppen wurde der höchste mittlere Proteinscore bei Kinasen registriert, die in allen drei Studien identifiziert wurden.

Von zwei dieser Kinasen, NEK9 (PK) und PDXK (Nicht-PKs), die in allen drei Studien mit einem sehr hohen mittleren Proteinscore (12991 und 22964) identifiziert wurden, sind exemplarisch Fragmentationen-Spektren in Abbildung 4-9 zu sehen.

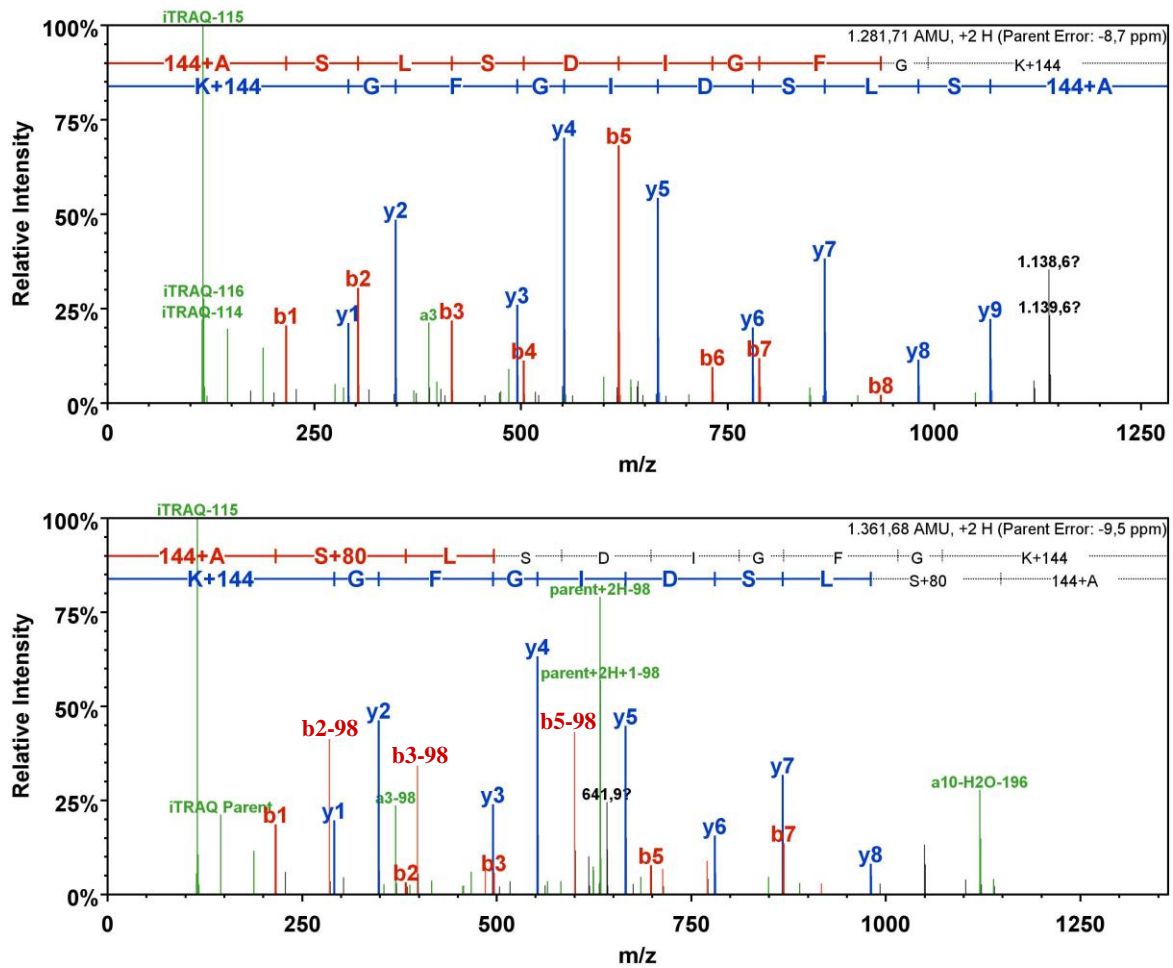


**Abb. 4-9: Fragmentationen-Spektrum** (A) des Peptides GQVLNSDELQELYEGLR der Nicht-PK PDXK und (B) des Peptides AGGGAAEQEELHYIPR der PK NEK9. Die beinahe vollständigen b- und y-Ionenserien, die bei der Fragmentierung entstanden, wurden mit theoretisch ermittelten Massen in der Swissprot-Datenbank abgeglichen. Dadurch ließen sich die Peptide eindeutig identifizieren und den Proteinen zuordnen. PDXK und NEK9 zeichnen sich beide durch einen hohen mittleren Proteinscore aus.

#### 4.3.2 CHARAKTERISIERUNG DER PHOSPHORYLIERUNGEN DES NIEREN-KINOMS

Phosphorylierungen steuern die Aktivität und/oder Interaktionen einer Kinase. Daher war es neben der effizienten Anreicherung und Analyse von Kinasen genauso wichtig Phosphorylierungen untersuchen zu können. Für eine umfangreiche Studie der Phosphorylierungen an Kinasen wurden diese phosphorylierten Peptide aus einem komplexen Peptidgemisch gezielt angereichert. Das hierzu verwendete Verfahren IMAC basiert auf einer Affinität von immobilisierten kationischen Metall-Ionen zur anionischen Phosphatgruppe. Auf Grund der begrenzten Probenmenge wurde ein konservatives Verfahren ausgewählt, damit die phosphorylierten Peptide gezielt von nichtphosphorylierten Peptide getrennt und per LC-MS/MS analysiert werden konnten.

Durch die Peptid-Sequenzierung mittels LC-MS/MS konnte eine Phosphorylierung detektiert und gezielt zu einem Peptid bzw. einer Kinase zugeordnet werden. Darüber hinaus bestand die Möglichkeit einer gezielten Zuordnung der Phosphorylierungen zu einer der spezifischen Aminosäuren (Serin/Threonin/Tyrosin). Dabei werden die Peptidmuttermasse und die innerhalb eines Fragmentionen-Spektrums aufgetretenen Fragmentionen-Massen gegen Mascot, eine Datenbank mit theoretisch bestimmten Massen, geschickt. Die Peptidmuttermasse eines phosphorylierten Peptides zeichnet sich im Vergleich zu dem korrespondierenden nicht-phosphorylierten Peptid durch eine zusätzliche Masse von 80 Da (Phosphat,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) aus. In der nachfolgenden Fragmentierung im MS/MS Modus hinterließen phosphorylierte Serine, Threonine und Tyrosine ein spezifisches Fragmentmassenmuster. Im Gegensatz zu Tyrosin, welches durch einen stabilen, aromatischen Ring vor einem Verlust des Phosphates in der Kollisionszelle geschützt wird, treten bei der Fragmentierung von Serin und Threonin Masseverluste von 98 Da (Phosphorsäure,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) auf. Es resultieren spezifische Masseninkremente von 69 Da ( $\text{pSer} - \text{H}_3\text{PO}_4 = \text{Dehydroalanin}$ ) und 83 Da ( $\text{pThr} - \text{H}_3\text{PO}_4 = \text{Dehydroaminobuttersäure}$ ), die bei der anschließenden Auswertung Serin und Threonin zugeordnet werden konnten. In Abbildung 4-10 wurden exemplarisch Fragmentionen-Spektren der Kinase PCTK3 abgebildet, die ein phosphoryliertes Peptid und das korrespondierende nicht-phosphorylierte Peptid zeigen.



**Abb. 4-10: Fragmentionen-Spektrum des phosphorylierten und korrespondierenden nicht-phosphorylierten Peptides ASLSDIGFGK vom Protein PCTK3 aus Studie I.** Während im oberen Spektrum das nicht-phosphorylierte Peptid eine Gesamtmuttermasse von 1281,71 Da aufweist, verzeichnet das untere, modifizierte Peptid einen Massenshift um 80 Da ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) zu einer Gesamtpeptidmasse von 1361,68 Da. Diese Peptidmuttermasse und die innerhalb eines Fragmentionen-Spektrums aufgetretenen Fragmention-Massen wurden gegen die Mascot, einer Datenbank mit darin befindlichen theoretisch berechneten Massen, geschickt. Da die Phosphorylierung an Serin und Threonin im MS/MS-Modus instabil ist, geht die Fragmentierung mit einem Massenverlust von 98 Da einher. Anhand der B-Ionen konnte an diesem Beispiel nicht nur gezeigt werden, dass dieses Peptid modifiziert war, es wurde vielmehr eine korrekte Phosphorylierungsstelle, phosphoSerin 2, zugeordnet.

Durch die Kombination der IMAC-Fraktionierung mit der Kinase-Affinitätschromatographie konnten zwischen 79% und 86% der phosphorylierten Peptide 106 Kinasen zugeordnet werden. Über alle drei Studien hinweg wurden 2381 Fragmentionen-Spektren generiert, die Peptidsequenzen von 357 phosphorylierten Peptiden an Kinasen repräsentieren. Darunter waren zwei atypische PKs und 99 PKs, bei den sich die identifizierten, phosphorylierten Peptide über alle Kinase-Gruppen gleichmäßig verteilten (Abb. 4-11).



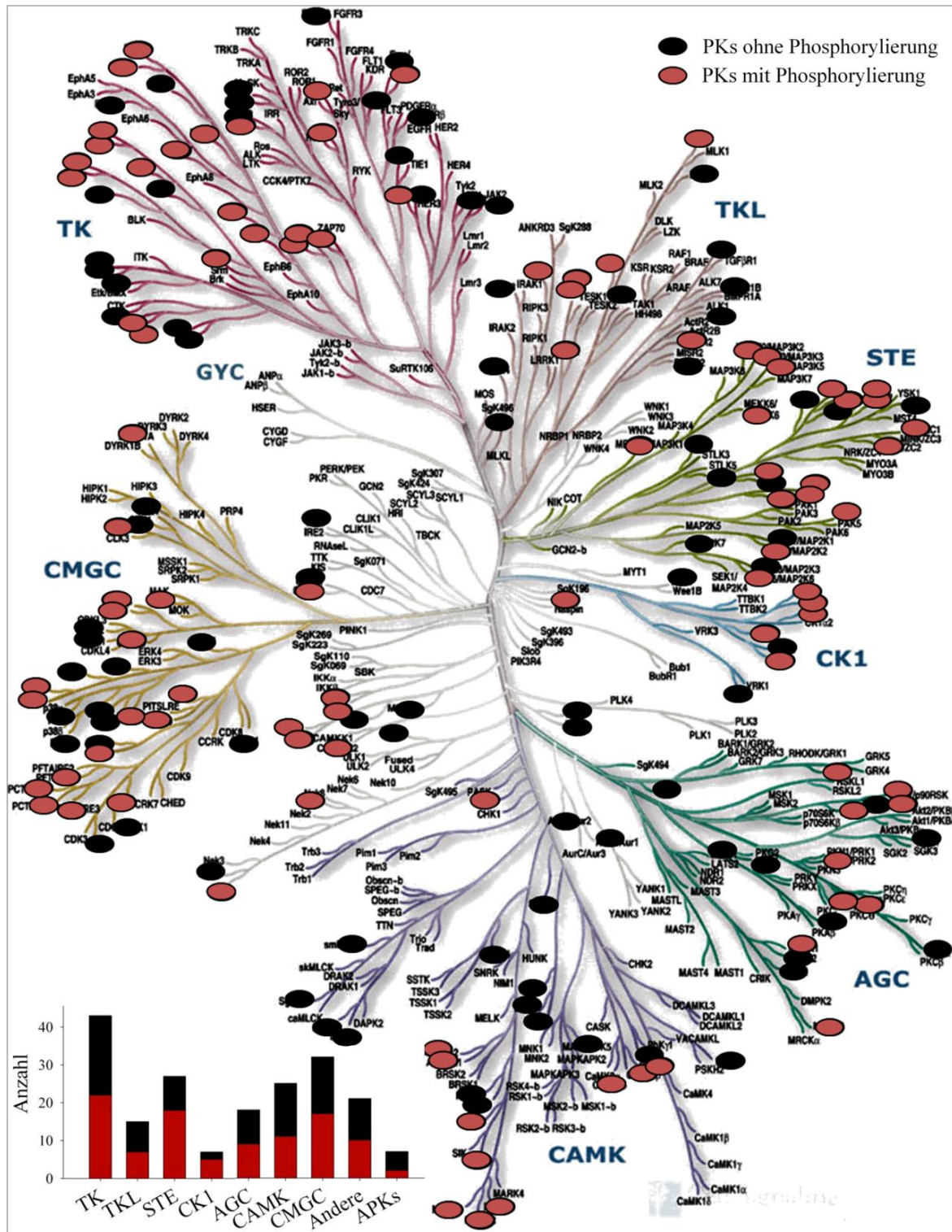
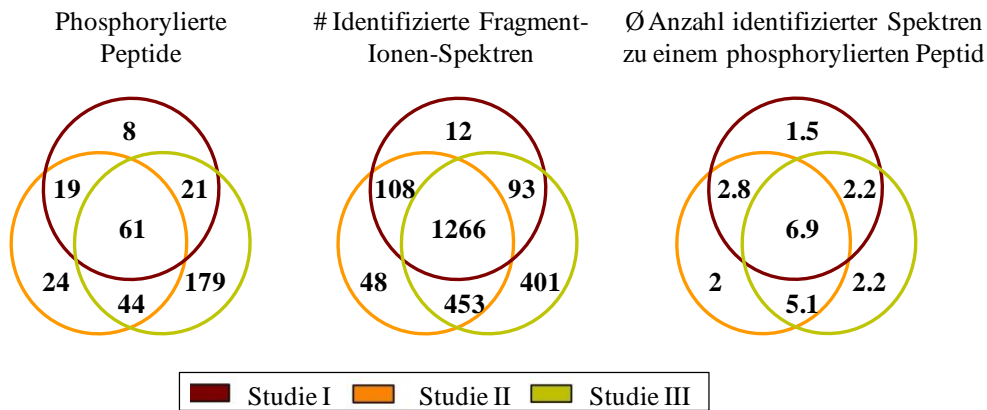


Abb. 4-11: Das Phospho-Kinom in dem RCC auf Grundlage des phylogenetischen Stammbaums von Manning [36]. Insgesamt wurden 188 Proteinkinasen durch Kinase-selektive Affinitätschromatographie angereichert (mit schwarzen Kreisen im Kinombaum markiert). Zusätzlich konnten bei über 50% der identifizierten Proteinkinasen Phosphorylierungen zugeordnet werden (rote Kreise). Beim Säulendiagramm wurden alle identifizierten Kinasen (schwarz) und die Anzahl der Kinasen mit Phosphorylierungen (rot) in die verschiedenen Kinase-Gruppen eingeordnet. Dabei wird ersichtlich, dass über alle Gruppen hinweg, ungefähr die Hälfte aller identifizierten Kinasen mit Phosphorylierungen assoziiert ist.

Die phosphorylierten Peptide enthielten sowohl Einfach- als auch Mehrfach-Phosphorylierungen, die an ca. 364 verschiedenen Serin-, Threonin- und Thyrosinresten nachgewiesen werden konnten (Anhang Tab. 7-3). Dabei verteilten sich die Phosphorylierungen auf diese Aminosäuren in einem pSer:pThr:pTyr-Verhältnis von 80.3:14.6:5.1, was zeigt, dass Serin wie erwartet die am häufigsten phosphorylierten Aminosäure ist.

Durch die Verwendung des sensitiveren Massenspektrometers in der dritten proteomischen Studie erhöhte sich die Anzahl gemessener phosphorylierter Peptide um 50%. Phosphorylierte Peptide, die aber in mindestens zwei der Studien vorkamen (40%), wurden mit einer höheren Anzahl an Fragmentionen-Spektren identifiziert (Abb. 4-12).



**Abb. 4-12: Menge detektierter Phosphorylierungen.** Die Venndiagramme beziehen sich auf die drei durchgeführten, proteomischen Studien (Rot: Studie I; Orange: Studie II; Gelbgrün: Studie III). 357 phosphorylierte Peptide (links) wurden anhand von 2381 Fragment-Ionen-Spektren (mitte) bei Proteinkinasen identifiziert. Über 40% der Phosphorylierungen wurden dabei reproduzierbar in mindestens zwei Analysen detektiert. Phosphorylierte Peptide, die in mehreren Studien identifiziert wurden, wurden durch eine höhere Anzahl an generierten Fragment-Ionen-Spektren repräsentiert.

Um einen Überblick zu erhalten, welche Phosphorylierungsstellen bereits funktionell beschrieben wurden und die Aktivität oder Interaktionen einer Kinase steuern, wurden die experimentell identifizierten 364 Phosphorylierungen mit der Datenbank ‚PhosphoSitePlus‘ von Cell Signaling Technology Inc. abgeglichen. Bei ca. 40 Phosphorylierungen wurde bereits ein Einfluss auf die zelluläre Funktion der Kinasen beschrieben. Zusätzlich wurden durch diesen Abgleich 16 Phosphorylierungsstellen identifiziert, die mit dieser Arbeit erstmalig in humanen Zelllinien und Geweben analysiert und annotiert wurden (Anhang Tab. 7-4).

## 4.4 QUANTITATIVE ANALYSE

### 4.4.1 ERSTELLUNG VON PHOSPHO-KINOM-REGULATIONSPROFILIEN IM RCC

Die Anreicherung und Identifizierung von Kinasen und deren Phosphorylierungen aus *ex-vivo* Gewebe bildeten die Basis für quantitative Analysen zum Nachweis RCC-spezifischer Veränderungen des Kinoms. Dabei sollten in erster Linie gesundes und krankes Gewebe direkt miteinander verglichen werden. Aus diesem Grund wurden die Peptide im Arbeitsablauf chemisch markiert [92]. Das Anfügen von sogenannten iTRAQ™-Reportern ermöglichte es, eine relative Quantifizierung der phosphorylierten und nicht phosphorylierten Peptide durchzuführen und Regulationsfaktoren für die Peptide und die dazugehörige Kinase zu ermitteln.

#### Markierungsstrategien für die quantitative Massenspektrometrie

Für die relative Quantifizierung standen vier iTRAQ™-Reagenzien mit unterschiedlich schweren Reportern (114, 115, 116 oder 117Da) zur Verfügung. Nach dem proteolytischen Verdau konnten die Peptide verschiedener Proben mit je einem iTRAQ-Reagenz an den N-terminalen Aminosäuren und zusätzlich an den Lysinseitenketten markiert werden.

Werden für die proteomischen Studien lediglich zwei iTRAQ-markierte Proben für die nachfolgende massenspektrometrische Analyse kombiniert, spricht man von der sogenannten Duplex-Markierung. Hingegen ermöglicht die Verwendung von vier iTRAQ Reagenzien eine 4plex-Markierung und somit die relative Quantifizierung der Proben (gesundes und erkranktes Gewebe) zweier Patienten in einem experimentellen Ansatz.

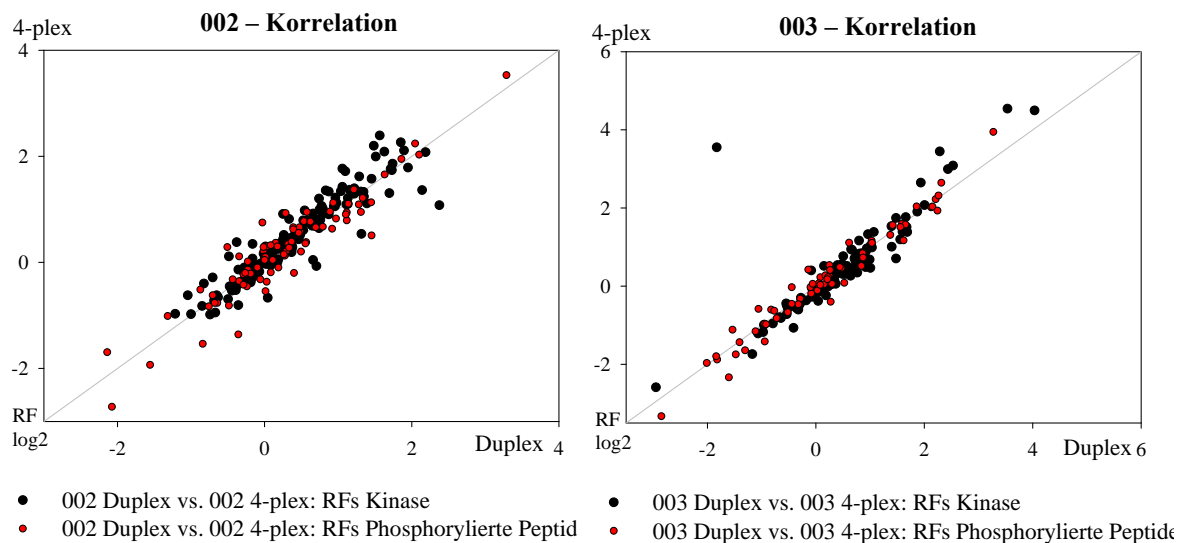
Zur Prüfung und Optimierung der Markierungsstrategien für die Studien des humanen Kinoms im RCC wurden beide Markierungsvarianten mit den eluierten Proteinen aus dem ersten Experiment (Patienten 002 und 003) durchgeführt. Dafür wurden die Proteine der Kinase-angereicherten Elutionen verdaut, die Menge halbiert, mit iTRAQ markiert und entsprechend eines Duplex- oder 4plex-Verfahrens vereint (Tab. 4-3).

**Tab. 4-3: Duplex- und 4plex-Markierung der Proben 002 und 003**

Markierungsstrategien	N002	T002	N003	T003
Duplex	114 [~150 µg]	116 [~150 µg]	115 [~125 µg]	117 [~100 µg]
4plex	114 [~125 µg]	115 [~125 µg]	116 [~125 µg]	117 [~100 µg]



Innerhalb der Fragmentierung im Massenspektrometer wurden die iTRAQ-Label vom Peptid abgespalten. Die jeweiligen Reportermassen befinden sich im niedermolekularen Bereich eines Spektrums und beeinträchtigen nicht die für die Peptidsequenzierung benötigten Fragmentationen. Anhand der jeweiligen iTRAQ-Reporterintensitäten konnten mit der Software iTRAQassist statistisch abgesicherte Regulationswerte für jedes einzelne Peptid/Phosphopeptid berechnet werden. Die Regulationsfaktoren nicht-phosphorylierter Peptide eines Proteins wurden dabei zu einem Protein-spezifischen Regulationsfaktor zusammengefasst. Für die statistische Auswertung beider Markierungsvarianten mit den Proben der Patienten 002 und 003 wurden neben den generellen Regulationsfaktoren der Kinase (**KRFs**) auch die Regulierungen der phosphorylierten Peptide (**pRFs**) mit einbezogen. Zum einen soll durch den statistischen Vergleich der Einfluss der zwischenzeitlichen Lagerung (-70°C) auf die Phosphorylierungen betrachtet werden, da die Analysen nacheinander durchgeführt wurden, zum anderen geben die generierten RFs einen Eindruck von der Reproduzierbarkeit des Markierungsvorgangs und der folgenden Vermessung durch das Massenspektrometer.



**Abb. 4-13: Korrelationsanalysen der zwei Markierungsverfahren.** Mit den Patientenproben 002 (links) und 003 (rechts) wurden sowohl Duplex- als auch 4plex-Markierungen durchgeführt. Die Regulationsfaktoren, der in beiden Analysen identifizierten Kinasen und phosphorylierten Peptiden, wurden gegeneinander aufgetragen. Da die RFs auf einer Linearen angeordnet werden können, weisen sie, bis auf wenige Ausreißer, eine signifikant hohe Korrelation auf.

Sowohl die KRFs als auch die pRFs waren bei den beiden Markierungsprozessen beinahe identisch. Der Pearson-Korrelationskoeffizient lag für die Kinasen mit 0.926 bei Patient 002 und 0.844 bei dem Vergleich der Kinase-RFs von Patient 003 nahe dem Wert von 1,

bei dem ein vollständig positiver linearer Zusammenhang zwischen den Proben bestehen würde. Ebenso verzeichnet die Korrelationsanalyse der phosphorylierten Peptide sehr hohe Werte bei der Gegenüberstellung beider Markierungsvorgänge (002 = 0.937; 003 = 0.98). Damit wies die massenspektrometrische Vermessung der iTRAQ-markierten Peptide eine bemerkenswert hohe Reproduzierbarkeit über alle Experimente auf. Lediglich die Anzahl der Identifizierungen von Kinasen und Phosphorylierungsereignisse variierte, was bei einer zufälligen und automatisierten Peptidsequenzierung in komplexen Proben den Erwartungen entspricht. Die gemeinsame massenspektrometrische Analyse der vier Proben ermöglichte die Identifizierung von 159 Kinasen und 104 phosphorylierten Peptiden. Durch die getrennte Vermessung der aus gesundem und krankem Gewebe von Patient 002 und 002 extrahierten Proteine wurden 141 bzw. 82 Kinasen und 173 bzw. 89 Phosphorylierungen identifiziert.

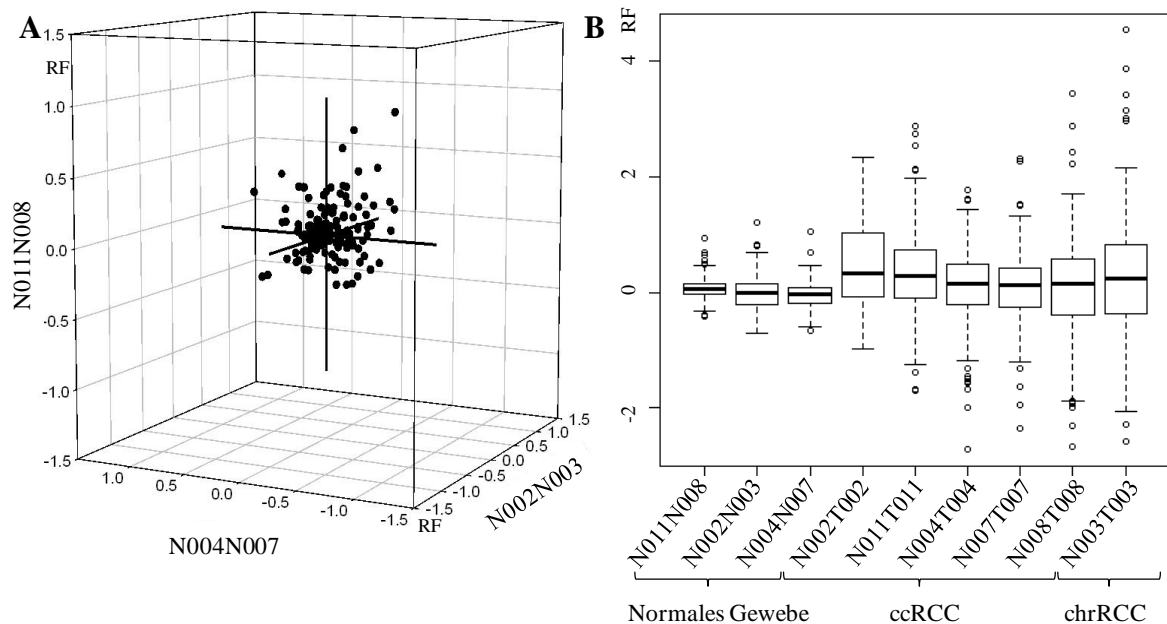
Für die nachfolgenden Phospho-Kinom-Studien der Patienten 004 und 007, sowie 008 und 011, wurde die 4plex-Markierung verwendet, da sie es ermöglichte, Gewebe zweier Patienten parallel zu analysieren. Zum einen wurde dadurch eine höhere Anzahl von Kinasen identifiziert, zum anderen konnten zusätzlich die beiden gesunden Gewebe miteinander verglichen werden. Insgesamt wurden in drei Studien sechs Phospho-Kinom-Profile des Nierenzellkarzinoms und drei Profile bezüglich der Patientendiversität erstellt (Tab. 4-4, Anhang Tab. 7-2). Alle neun Profile enthalten regulatorische Informationen zu den identifizierten Kinasen und Phosphorylierungen.

**Tab. 4-4: Probenarrangement zur Erstellung der RCC Phospho-Kinom-Regulationsprofile**

Studie	Patient Nr.	Gewebe	iTRAQ- Reporter	RCC Phospho- Kinom-Profile	Annotierung Vergleich gesunder Gewebe
I	002	Niere	114	N002T002	N002N003
	002	Tumor	115		
	003	Niere	116	N003T003	
	003	Tumor	117		
II	004	Niere	114	N004T004	N004N007
	004	Tumor	115		
	007	Niere	116	N007T007	
	007	Tumor	117		
III	008	Niere	114	N008T008	N011N008
	008	Tumor	115		
	011	Niere	116	N011T011	
	011	Tumor	117		

#### 4.4.2 ANALYSE UND VERGLEICH DER KINASE-REGULATIONSPROFILE

Insgesamt konnten mit Hilfe der 4plex-Markierungsstrategie in drei Studien die Gewebeproben von sechs Patienten auf Veränderungen des Phospho-Kinoms im RCC hin untersucht werden. Damit bot die Charakterisierung der Kinasen des Nierenzellkarzinoms zudem die Chance die Unterschiede der untersuchten Patienten mit einzubeziehen und zu bestimmen. Der optischen Veranschaulichung dient ein 3D-Scatterplot (Abb. 4-14 A), bei dem die KRFs der drei Kinase-Regulationsprofile der gesunden Gewebe (N002N003; N004N007; N011N008) gegeneinander aufgetragen wurden. Er verdeutlicht, dass die meisten der Kinasen, beim Vergleich der gesunden Gewebe, keine signifikanten Veränderungen aufzeigen und zum größten Teil um den nicht regulierten Bereich variieren. Der Boxplot (Abb. 4-14 B) stützt diese Beobachtung und zeigt eine nur geringe Varianz der KRFs im gesunden Gewebe im Vergleich zu den Tumorseiten. Die Länge der Box entspricht dem Interquartilsabstand. Dieser Wertebereich beinhaltet die mittleren 50% aller Messwerte und ist beim Vergleich der gesunden Gewebe sehr schmal, während die KRFs im Tumorgewebe stärker variieren und die Box dadurch optisch strecken.

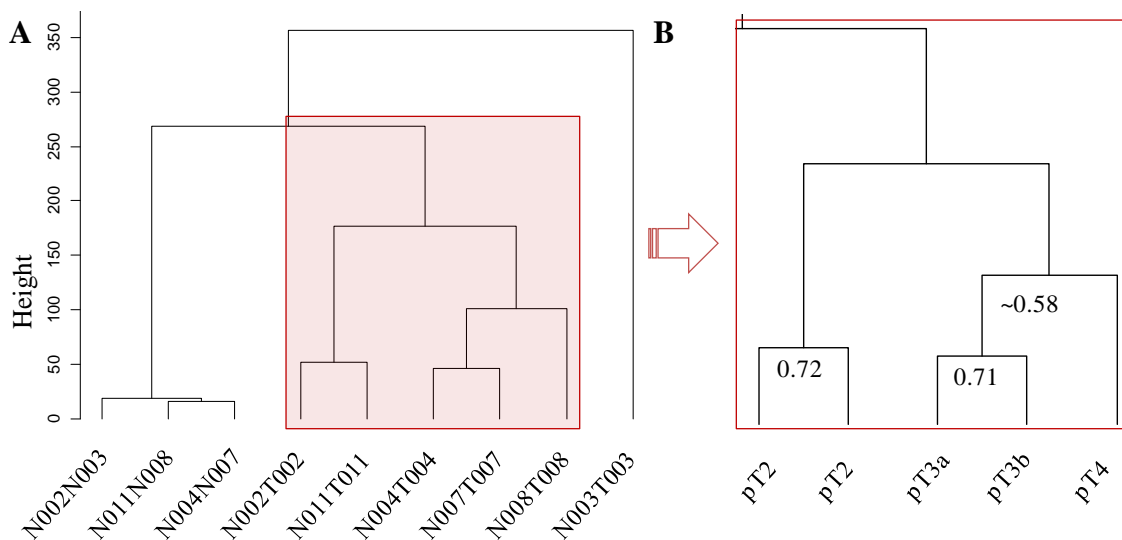


**Abb. 4-14: Geringe Varianz der Kinase-Regulationsprofile der gesunden Nierenparenchyme.** Bei den drei proteomischen Studien wurden jeweils die gesunden Gewebe zweier Patienten verglichen. Die KRFs wurden (A) für die Darstellung in einem dreidimensionalen Raum verwendet, wobei die drei generierten Kinase-Regulationsprofile direkt gegeneinander aufgetragen und (B) in einem Boxplot eingegliedert wurden. Die Länge der Box umfasst die mittleren 50% aller Messwerte. Beide Abbildungen verdeutlichen die minimale Streuung der KRFs bei den gesunden Geweben. Im Vergleich dazu variieren die KRFs im Tumorgewebe deutlich stärker, was den Boxplot optisch streckt. Zudem streuen die Regulationswerte der Kinasen im Tumor stärker, was durch die Kreise im Boxplot wiedergegeben wird.

### RCC-Kinase-Regulationsprofile in Übereinstimmung mit der Klassifizierung

Von insgesamt sechs Patienten, die an einem Nierenzellkarzinom erkrankt waren, konnten mit Hilfe der quantitativen Proteomik, Regulationsprofile von Kinasen und Phosphorylierungen erstellt werden. Dabei wurden Nierenzellkarzinome unterschiedlicher Entwicklungsstadien und Differenzierungsgrade ausgewählt, um einen Querschnitt über die Stadien hinweg zu erhalten.

Die Differenzierung dieser Stadien wurde auch in der Clusteranalyse ersichtlich, die auf den Regulationsfaktoren der Kinasen basiert und die Tumorproben nach Ähnlichkeit bzw. Verwandtschaftsgrad gliedert (Abb. 4-15). Das Clustern der Proben erfolgte auf der Basis der quadratischen euklidischen Abstände (Summe der quadratischen Differenzen) der (log2)-KRFs. Je näher Tumorproben auf Grund ihres Entwicklungsstadiums und Differenzierungsgrades miteinander verwandt waren, desto früher wurden sie in dem Cluster zusammengefasst. Das sich über die Stadien hinaus die Kinase-Regulationsprofile der Tumorproben ähnlich zueinander verhalten, zeigt sich an dem großen, einheitlichen Cluster, welches alle fünf klarzelligen Nierenzellkarzinome umschließt. Die zusätzlich erstellten Korrelationswerte stimmten mit den Clusteranalysen überein und zeigten ebenfalls eine starke Korrelation zwischen den Tumoren gleichen Stadiums (pT2: 002/003; pT3a/b: 004/007, pT4: 008) (Abb. 4-15 B).



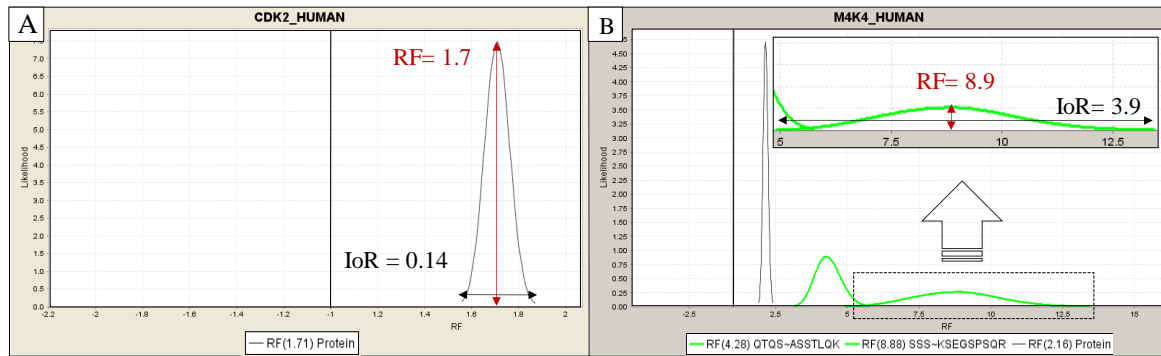
**Abb. 4-15: Clusteranalyse der erstellten RCC-Kinase-Regulationsprofile.** (A) Die Clusteranalyse wurde anhand der KRFs durchgeführt und erfolgte nach dem (quadrierten) euklidischen Abstand. Dafür wurden sowohl die Profile aus dem Vergleich der gesunden Gewebe aufgetragen, als auch die Regulationsprofile der Tumorproben. Das Hauptcluster, welches den klarzelligen RCC-Typ beinhaltet, wurde optisch hervorgehoben und in (B) mit den Stadien, sowie den Korrelationsfaktoren annotiert. Diese bestätigen mit ihrem hohen Wert die Korrelation der Tumore bezüglich ihrer Kinasen und der untersuchten Stadien.

Der chromophobe Tumor des Patienten 003 wurde bei der Clusteranalyse hingegen von allen klarzelligen Tumoren und auch vom gesunden Gewebe separiert. Das weist darauf hin, dass bei diesem Subtyp differenzielle Regulierungen vorliegen, die sich deutlich vom klarzelligen Typ unterscheiden.

Damit stehen die quantitativen Ergebnisse dieser Proteomstudie im Einklang mit der Klassifizierung, die auf Basis der klinischen/pathologischen Befunde festgelegt wurden. Die Kinase-Regulationsprofile der ccRCC können nun im weiteren Schritt nach ccRCC-spezifischen Veränderungen hin untersucht werden.

#### 4.4.3 **PARAMETER VERÄNDERTER KINASEN: REGULATIONSFAKTOREN UND IOR**

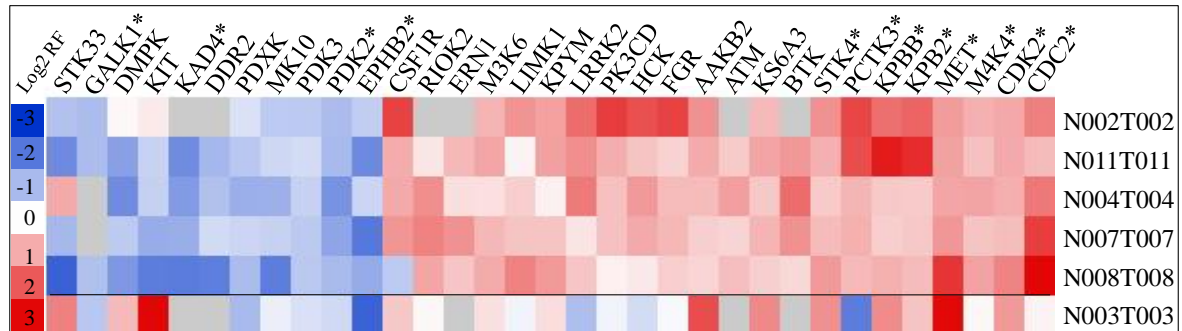
Sowohl für die Stadien-unabhängige als auch für die Stadien-spezifische Bestimmung veränderter Kinasen wurden die Regulationsfaktoren aller 221 Kinasen verwendet. Damit beinhaltet die Regulationsstudie neben den Proteinkinasen auch die atypischen PKs, die regulatorischen Untereinheiten und die Kinasen des Metabolismus. Um eine Kinase als signifikant reguliert zu betrachten, mussten verschiedene Kriterien erfüllt sein. Als Erstes wurden die Grenzwerte auf -1.5 bzw. 1.5 festgelegt, basierend auf anderen proteomischen Studien, die iTRAQ bereits als Markierungsmethode verwendeten [99,100,112,113]. Neben der Festlegung dieses minimalen Schwellenwertes wurde insbesondere die Qualität der zugrunde liegenden Daten statistisch analysiert und einbezogen. Dafür wurde der von iTRAQassist berechnete IoR (‘interval of robustness’ – Intervall der Robustheit) berücksichtigt, welcher die Robustheit der Reporterintensitäten anhand eines Rauschmodells bestimmt und die mögliche Varianz der Peptid-Regulationsdaten einkalkuliert. Die Qualität der Daten und der IoR werden durch die Höhe und Breite der von iTRAQassist generierten Likelihood-Kurven angezeigt (Abb. 4-16). Der höchste Punkt der Likelihood-Kurve spiegelt als Regulationsfaktor das wahrscheinlichste Proteinverhältnis zwischen zwei analysierten Proben wieder. Bei den beiden regulierten Kinasen CDK2 (Patient 007) und M4K4 (Patient 008) beträgt der RF somit 1.7 bzw. 2.16 (Abb. 4-16). Je kleiner der dazugehörige IoR, desto schmaler ist eine Kurve und desto statistisch signifikanter ist der kalkulierte RF. Bei einer entsprechenden Varianz der Peptide oder niedrigen Reporterintensitäten wurde eine Likelihood-Kurve berechnet, die wie in Abbildung 4-16 B sehr flach ist und einen hohen IoR Wert aufweist. Da aber die Kurve den Ursprung (RF = 1) in keinem Bereich schneidet, ist dieses phosphorylierte Peptid, mit einem p-Wert von höchstens 10%, reguliert.



**Abb. 4-16: Graphische Darstellung der signifikant regulierten Kinase CDK2 und M4K4.** Während der Peak der Likelihood-Kurve den wahrscheinlichsten Regulationsfaktor angibt, spiegelt der IoR (,Interval of Robustness‘) die Qualität und Varianz der Regulationsdaten wieder. (A) In dem Likelihood Plot wird die regulierte Kinase CDK2 dargestellt. Der RF wurde aus dem Vergleich von Tumor und gesundem Gewebe des Patienten 007 ermittelt und liegt mit 1.7 liegt knapp über dem Schwellenwert von 1.5. Die schmale Kurve mit dem kleinen IoR (0.14) verweist aber auf die Qualität der dahinter liegenden Daten. (B) Der Regulationsfaktor der Phosphorylierung von M4K4 ist mit 8.9 sehr hoch, dennoch weist diese Likelihood-Kurve einen breiten IoR (3.9) auf. Da diese Kurve aber den unregulierten Bereich (Linie bei 1) nicht schneidet, ist die Regulation ebenso wie die für die KRF von CDK2 statistisch abgesichert.

#### 4.4.4 REGULIERTE KINASEN, DIE DAS NIERENZELLKARZINOM STADIEN-UNABHÄNGIG CHARAKTERISIEREN

Die untersuchten Proben, der in diesen Studien eingeschlossenen Patienten, deckten mit den verschiedenen Stadien die unterschiedliche Bereiche der Tumorentwicklung, Ausbreitung und Differenzierung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms ab (2x pT2 (Stadium II, Grad 2), pT3a (III; G2), pT3b (IV, G2), pT4 (IV, G2-3). Mittels quantitativer Proteomik wurden 33 Kinasen identifiziert (Abb. 4-17) die Stadien-unabhängig konsistent Veränderungen im Tumor aufwiesen. Kinasen, wie c-Met, CDK2, PCTK3 und EPHB2, waren in allen fünf ccRCC-Proben signifikant reguliert. Kinasen, die wie LRRK2, DDR2 und CSF1R, in nur einer von fünf ccRCC-Proben keine signifikante Regulation erreichten, wurden entsprechend gekennzeichnet in die Ergebnislisten aufgenommen. Hierdurch sollte vermieden werden, dass durch individuelle Patientenvariationen Hinweise zu RCC-relevanten Kinasen ausgeschlossen werden. Um zusätzlich einen Einblick über die Spezifität der Änderungen im ccRCC zu erhalten, wurden die Analyse-Ergebnisse des einzigen chromophoben Tumors (chrRCC) vergleichend hinzugezogen.

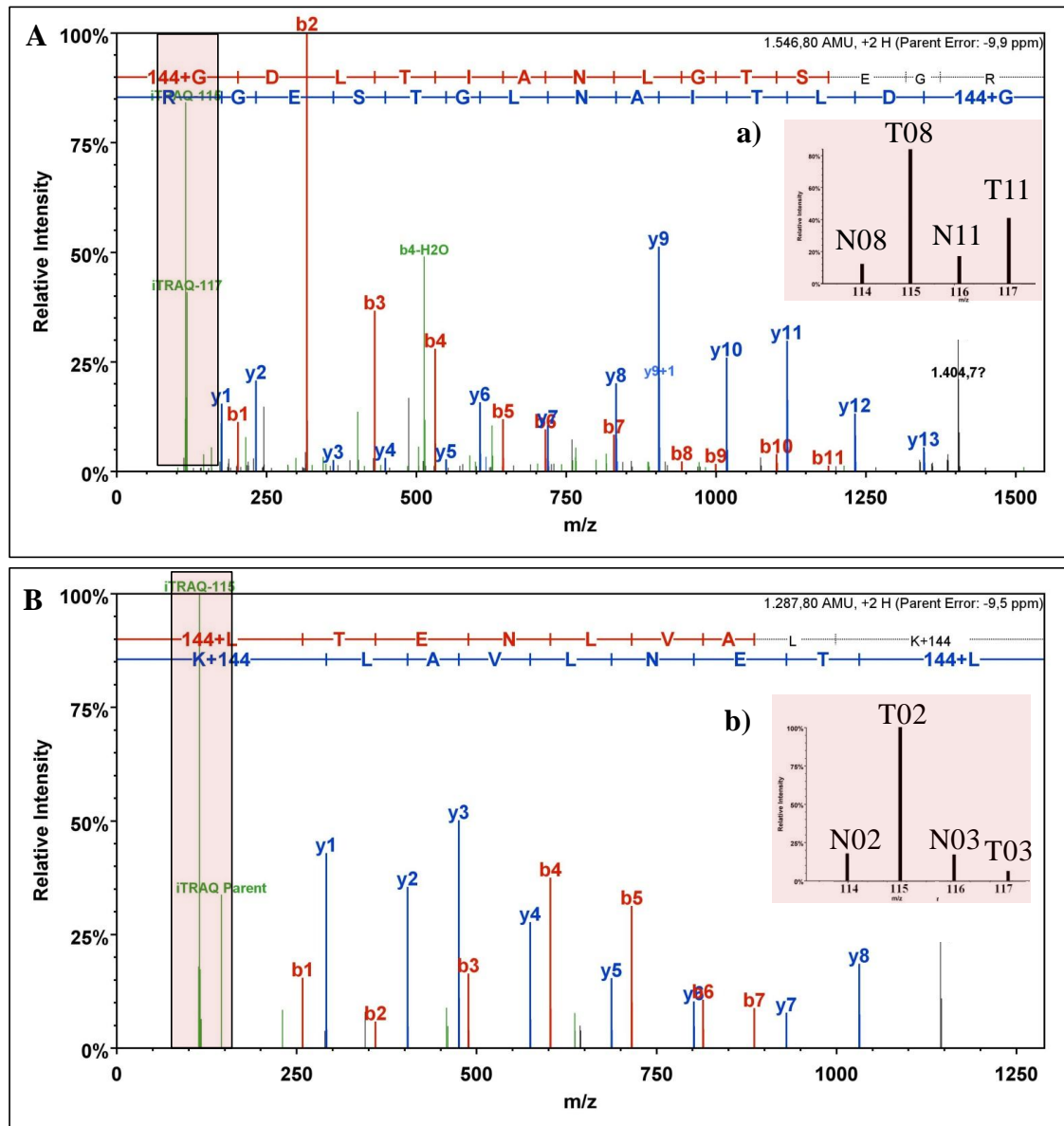


**Abb. 4-17: Regulierte Kinasen, welche unabhängig von der Entwicklung und Ausbreitung des Tumors auftraten.** Insgesamt wurden 33 Kinasen mit unterschiedlicher Reporterintensität bezüglich Tumor- und gesundem Gewebe identifiziert. Die abgebildete Heatmap beinhaltet alle in ihrer Häufigkeit veränderten Kinasen mit ihren (Log2)-Regulationsfaktoren. Neben den fünf klarzelligen RCC wurden die Kinase-RFs des einmalig analysierten chromophoben RCC (N003T003) vergleichend hinzugezogen.

\* verweist auf Kinasen, die in allen klarzelligen RCC signifikant reguliert waren.

Exemplarisch werden die Fragmentionen-Spektren der zwei signifikant regulierten Kinasen MET und PCTK3 gezeigt. Anhand der jeweiligen iTRAQ-Reporterintensitäten (Abb. 4-18 a / b) konnten mit der Software iTRAQassist statistisch abgesicherte Regulationswerte berechnet werden. Die iTRAQ-Reporter des Peptides GDLTIANLGTSEGR der Rezeptor-Tyrosinkinase MET repräsentieren die höchste Intensität jeweils bei den Tumorproben. Hingegen zeigt das Peptid LTENLVALK der Kinase PCTK3 eine gegensätzliche Regulation. Die Ursache liegt bei den in der ersten Studie untersuchten, unterschiedlichen RCC-Typen. Während in allen klarzelligen Tumorproben eine erhöhte Menge von PCTK3 identifiziert wurde, ist das chromophobe Tumorgewebe durch eine Verminderung des Proteinlevels gekennzeichnet.

Nach der Identifizierung der regulierten Kinasen im ccRCC wurden diese in drei Kategorien eingeordnet. 12 Kinasen gehören der Kategorie I an, d.h. sie wurden im Zusammenhang mit dem Nierenzellkarzinom bereits beschrieben, wobei fünf dieser Kinasen lediglich in Hochdurchsatzmethoden (HTM), wie Microarrays oder Genexpressionsstudien, identifiziert wurden. Kategorie II beinhaltet veränderte Kinasen, deren Bedeutung bereits generell im Kontext von Tumorgenese und den einhergehenden physiologischen Veränderungen charakterisiert wurde. Für Kinasen der Kategorie III wurden bislang keine Publikationen mit Bezug zu einer Krebserkrankung oder -entwicklung verzeichnet. Die Einordnung der Kategorien, die Kennzeichnung der Kinasen und die Zuordnung zu bereits bekannten Veränderungen in jeglichen Krebsarten wurde manuell mittels gopubmed.org und pubmed.org durchgeführt (Tab. 4-5).



**Abb. 4-18: Quantifizierung der Fragmentationen-Spektren mit iTRAQ.** Die Regulationswerte wurden anhand der iTRAQ-Reporterionen bestimmt, die nach der Fragmentierung eines Peptidions im niedermolekularen Massenbereich auftraten (rosa Kästchen beim ~ 100 m/z Bereich). Die Intensität repräsentiert dabei die relative Menge des Proteins in der jeweiligen Probe. Als Beispiel wurde in (A) das Peptid GDLTIANLGTSEGR des Rezeptors c-MET aus Experiment III (Patienten 008 und 011) und in (B) das Peptid LTENLVALK des Proteins PCTK3 dargestellt. Im Peptidspektrum wurde die iTRAQ-Reporterregion im rechten Kästchen (a) und b)) farblich hervorgehoben. Mit den Reportern 114 und 116 (Normal = N) und 115 (Tumor = T) wurden die gesunden Gewebe, mit 115 und 117 die Tumorgewebe der Patienten markiert. Während c-MET in beiden Tumoren hochreguliert erscheint, zeigt PCTK3 ein gegenteiliges Regulationsprofil.

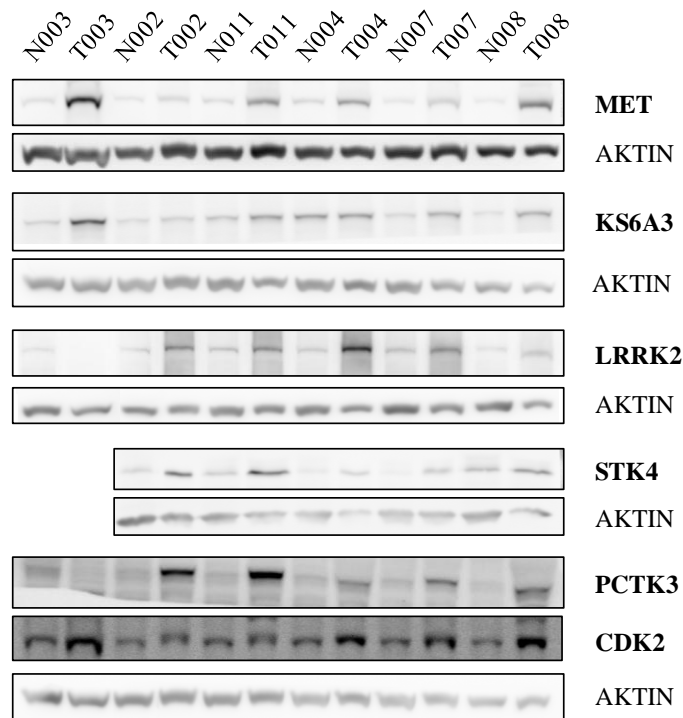


Tab. 4-5: Regulierte Kinasen mit Kategorie, Kennzeichen und Vorkommen.

Proteinname	Kateg.	Kennzeichen	Krebsarten
Adenylate kinase isoenzyme 4, mitochondrial _ KAD4	III	Energiemetabolismus, oxidativer Stress [19130895]	Lymphatische Leukämie [21422473], Dickdarmkrebs [19471023]
Tyrosine-protein kinase BTK _ BTK	II	inflammatorische Vorgänge, WNT-signaling [19471023]	Leukämie/Lymphom [20831363][19259548], Dickdarmkrebs [10091728];
Cyclin-dependent kinase 1 _ CDK1	II / (I)	Zellzyklus [19568282], Ziel von Inhibitor [21271220]	Reihe von primären Tumoren [19568282]
Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor _ CSF1R	I	Makrophagenproduktion, -differenzierung & -funktion	RCC: LTM [19377443], HTM [20381423];
Cyclin-dependent kinase 2 _ CDK2	II / (I)	Zellzyklus [19568282], Ziel von Inhibitor [21271220]	Brustkrebs [17956886]; Dickdarmkrebs [10091728]; verschiedene Malignome [19568282]
Discoilin domain-containing receptor 2 _ DDR2	II	Zellzyklus-arrest in Tumorzellen [16186104]	Lungenkrebs [17299390];
Myotonic Dystrophy, Wnt/ $\beta$ -catenin Signaltweg _ DMPK	II	Myotonic Dystrophy, Wnt/ $\beta$ -catenin Signaltweg , Tumorsuppressoren [7698644][19642006]	Kehlkopfkrebs [10797405], Plasmatrioxom u.a. [19642206]
Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease IRE1 _ ERN1	II	ER-Stress [17991856], Tumorstress, Angiogenese [17638880][16472113]	Prostatakrebs [20013084]
Ephrin type-B receptor 2 _ EPHB2	II	Tumorstress, Angiogenese [15300251]	Prostatakrebs [15300251], Darmkrebs [15973414][16272170]
Galactokinase 1 _ GALK1	III	Abbau von D-Galactose	RCC (HTM: [12068634]), Eierstockkrebs [121300758]
Tyrosine-protein kinase Fgr _ FGR	I / II	Komplementär zu Src, Angiogenese, Wachstum, Überleben [121300758]	RCC: HTM [12068634][12080328][20381423]
Tyrosine-protein kinase HCK _ HCK	I / III	Neuroangiogenese [12068634]	RCC: LTM [21220347], HTM [20381423][16964377]
Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2 _ LRRK2	I	Parkinson, Targets: u.a. 4E-BP1 [18701920] und AKT an der Aktivierungsstelle [21658387]	
LIM domain kinase 1 _ LIMK1	II	Zytoskelettorganisation [21682918], Angiogenese [20047470]	Brustkrebs [21682918], Bauchspeicheldrüsenkrebs [20047470]
Hepatocyte growth factor receptor _ MET	I	Entwicklung, Organregeneration und Krebs [21102609]	RCC: LTM [8682590] [16891811], HTM [11691851]
Mitogen-activated protein kinase 10 _ MK10	II	Proapoptose, Tumorsuppressoren [21166945]	Chromophob RCC [21166945], Lymphdrüsenkrebs [16572203]
Mitogen-activated protein kinase kinase 6 _ M3K6	II	Angiogenese und Tumorigenese [19246638]	
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 _ M4K4	I	Transformation, Invasion, Adhäsion und Zellmigration [18981001][16537454]	RCC: LTM [12612079]; Leberkrebs [21196414]; Adenokarzinom [18981001]
Cyclin-dependent kinase 18 _ PCTK3	I / II	Zellzyklus-arrest, Zelltod [16276348]	RCC: HTM [20381423];
Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta _ PK3CD	I / II	Angiogenese und Tumorigenese [19595306], PI3K/Akt/mTOR Signaltweg	Brustkrebs [17011986]; Glioma [16276348]
Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, liver isoform _ KPB2	III	Glykogenabbau [21460283]	RCC: [16707436][20448661][18587247]
Phosphorylase b kinase regulatory subunit beta _ KPBB	III	Glykogenabbau [21460283]	Prostatakrebs [19275762];
5'-AMP-activated protein kinase subunit beta-2 _ AAKB2	I	Energiemetabolismus [12203120][19584320]	RCC [20948309], Leukämie [15543237]
Pyridoxal kinase _ PDXK	II / III	Vitamin B(6) 'salvage' Enzym	Bauchspeicheldrüsenkrebs [12203120]
Pyruvate dehydrogenase [liponamide] kinase isozyme 2, mitochondrial _ PDK2	III	metabolische Wechsel von TCA zu Glykolyse	Magenkrebs [15559763], Lebertumor Morris-Hepatom [6259164]
Pyruvate dehydrogenase [liponamide] kinase isozyme 3, mitochondrial _ PDK3	III / (II)	metabolische Wechsel von TCA zu Glykolyse [18718909]	
Ribosomal protein S6 kinase alpha-3 _ KS6A3	II	Zellproliferation, Wachstum, Mortalität und Überleben	
Serine/threonine-protein kinase RIO2 _ RIOK2	III	Ribosomen Biosynthese [19544402][16182620][16183636]	
Serine/threonine-protein kinase 33 _ STK33	III / (II)	Proteinsynthese; Zell-Überlebensrate selektiv in Zellen mit KRAS Mutation [19490892]	
Serine/threonine-protein kinase 4 _ STK4	II	Apoptose [17932490] Tumorsuppression [20080598]	Prostatakrebs [17932490], Dickdarmkrebs [17277767]
Mast/stem cell growth factor receptor _ KIT	II	Tumorentwicklung und -verlauf [21057563]	Chromophob RCC [15105658][12584564]
Pyruvate kinase isozymes M1/M2 _ KPYM	I	aerobe Glykolyse und Tumorstress [21325052]	RCC: LTM [14513300] [17587357], HTM [18072195][21325052]
Serine-protein kinase ATM _ ATM	II	Zellzyklus-arrest, DNA Reparatur, Apoptose [19568282]	Prostatakrebs [14983937], Brustkrebs [10999741][17366603]

### Berücksichtigung der Affinität einer Kinase zum ATP-kompetitiven Inhibitor

Die gezielte Anreicherung und Untersuchung von Proteinkinasen erfolgte mittels kinase-selektiver Affinitätschromatographie. Veränderungen der Kinaseaktivität, der Konformation oder der Interaktionspartner könnten die ATP-Bindungstasche blockieren und die Bindung an den Inhibitor beeinflussen. Die nachgewiesene Regulation der Kinasen könnte daher auch durch ein verändertes Bindungsverhalten gegenüber den verwendeten ATP-Analoga verursacht werden. Zur Überprüfung wurden Western Blot Analysen mit dem ursprünglichen Ausgangszelllysats durchgeführt. Hierzu wurden sechs Kandidaten ausgewählt, die zum einen wie Met und CDK2 in allen Proben eindeutig reguliert waren oder wie LRRK2 und PCTK3 eine entgegengesetzte Regulation im chrRCC aufwiesen (Abb. 4-19). In den Western Blot Abbildungen wird ersichtlich, dass die ermittelten RFs als repräsentativ betrachtet werden können. Alle sechs Antikörper zeigten in den meisten Tumورproben eine deutlich Hochregulation im direkten Vergleich mit dem gesunden Gewebe. Bei genauer Betrachtung von PCTK3 sieht man eine deutlich stärkere Bande bei den Tumoren 002 und 011, die mit den ermittelten RFs der Phospho-Kinom Studien I und III korrespondierenden. Ähnliche, ebenfalls bestätigende Ergebnisse wurden bei MET und RSK2 erzielt, wo gerade der chromophobe Tumor (003) eine intensivere Bande aufweist.

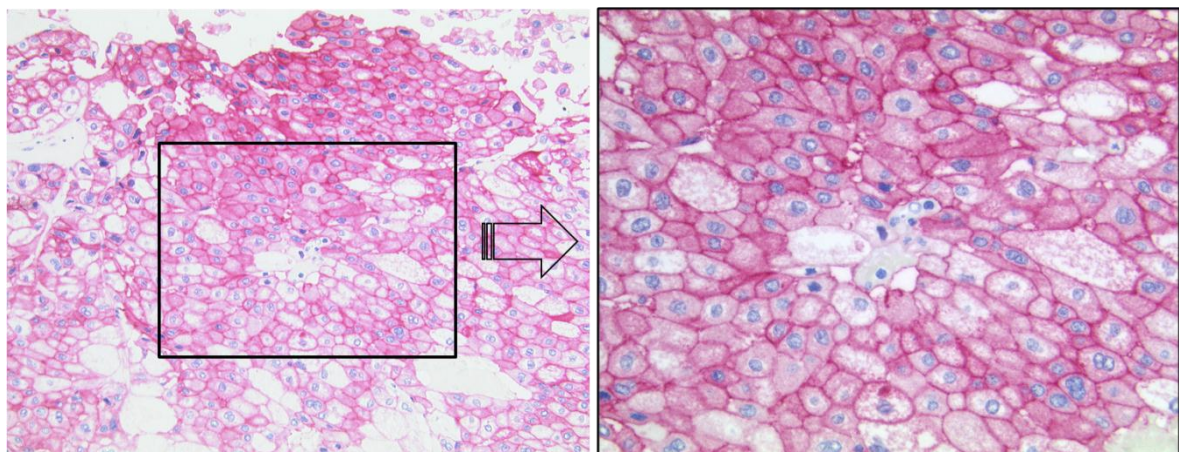


**Abb. 4-19: Western-Blot-Analyse mit sechs ausgewählten Kinasen.** Für den Western Blot wurden jeweils 30 µg des entsprechenden, ursprünglichen Gesamt-Zelllysats (Tumor- (T) und gesundes Gewebe (N)) verwendet. Die Proben wurden mittels 1D-GE (12% SDS-Gel) aufgetrennt, geblottet und mit dem gewünschten Primär-Antikörper (MET, KS6A3, LRRK2, STK4, PCTK3 und CDK2) behandelt. Aktin diente als Referenz.

## Vergleich der regulatorischen Informationen im klarzelligen RCC mit dem chromophoben Tumor

In den drei durchgeführten proteomischen Studien wurde neben fünf klarzelligen RCCs einmalig ein chromophobes Nierenzellkarzinom analysiert. Die dabei ermittelten Veränderungen der Kinasen können zwar stellvertretend für den Patienten, aber nicht stellvertretend für diesen Karzinomtyp beurteilt werden. Deshalb wurden die Analyse-Ergebnisse des chrRCC nur vergleichend zu den regulierten Kinasen des ccRCC betrachtet, um einen Eindruck über die Spezifität der Änderungen im ccRCC zu erhalten.

Insbesondere c-KIT (auch CD117) scheint im chromophoben RCC abweichend vom ccRCC reguliert zu sein. Um die Veränderung zu überprüfen, wurden Paraffinschnitte der sechs untersuchten RCCs durch Herrn Dr. Sperling vom Institut der Pathologie (Städtisches Klinikum, Braunschweig) unter Verwendung eines KIT-spezifischen Antikörpers immunhistochemisch gefärbt. Die einzige positive Reaktion wurde tatsächlich nur bei Patient 003 festgestellt (Abb. 4-20).



**Abb. 4-20: Immunohistochemische Färbung des chromophoben Tumors mit CD117.** Für die Analyse wurde ein Paraffinschnitt vom Tumor des Patienten 003 verwendet und durch Herrn Dr. Sperling vom Institut der Pathologie, Klinikum Braunschweig, mit einem spezifischen Antikörper gegen KIT (CD117) markiert. (links) Eine leicht positive zytoplasmatische Färbungen ist erkennbar, jedoch wird dieser Rezeptor deutlich stärker in der Membran der Tumorzellen detektiert.

Ähnlich wie KIT wichen die Regulationen der Kinasen LRRK2, PCTK3, HCK, DMPK und STK33 im chromophoben RCC qualitativ zu den detektierten Regulationen im klarzelligen Subtyp ab. Für LRRK2 und PCTK3 wurden diese Beobachtungen durch die Western Blot-Analysen und mit spezifischen Antikörpern bestätigt (Abb. 4-19). Diese Beobachtungen könnten ebenfalls zur Unterscheidung tumorspezifischer Veränderungen dienen.

### **Identifizierung veränderter Phosphorylierungsereignisse**

Neben den Veränderungen der relativen Menge der Kinasen konnten durch die erfolgreiche Anreicherung phosphorylierter Peptide zusätzlich Unterschiede innerhalb der Phosphorylierungsereignisse in den RCC-Proben analysiert werden. Insgesamt wurden 42 konsistente Veränderungen auf Ebene der post-translationalen Modifikation bei 21 Kinasen festgestellt. Die Phosphorylierungsstelle, die Richtung der Regulation und die Frequenz wurden in Tab. 4-6 aufgelistet.

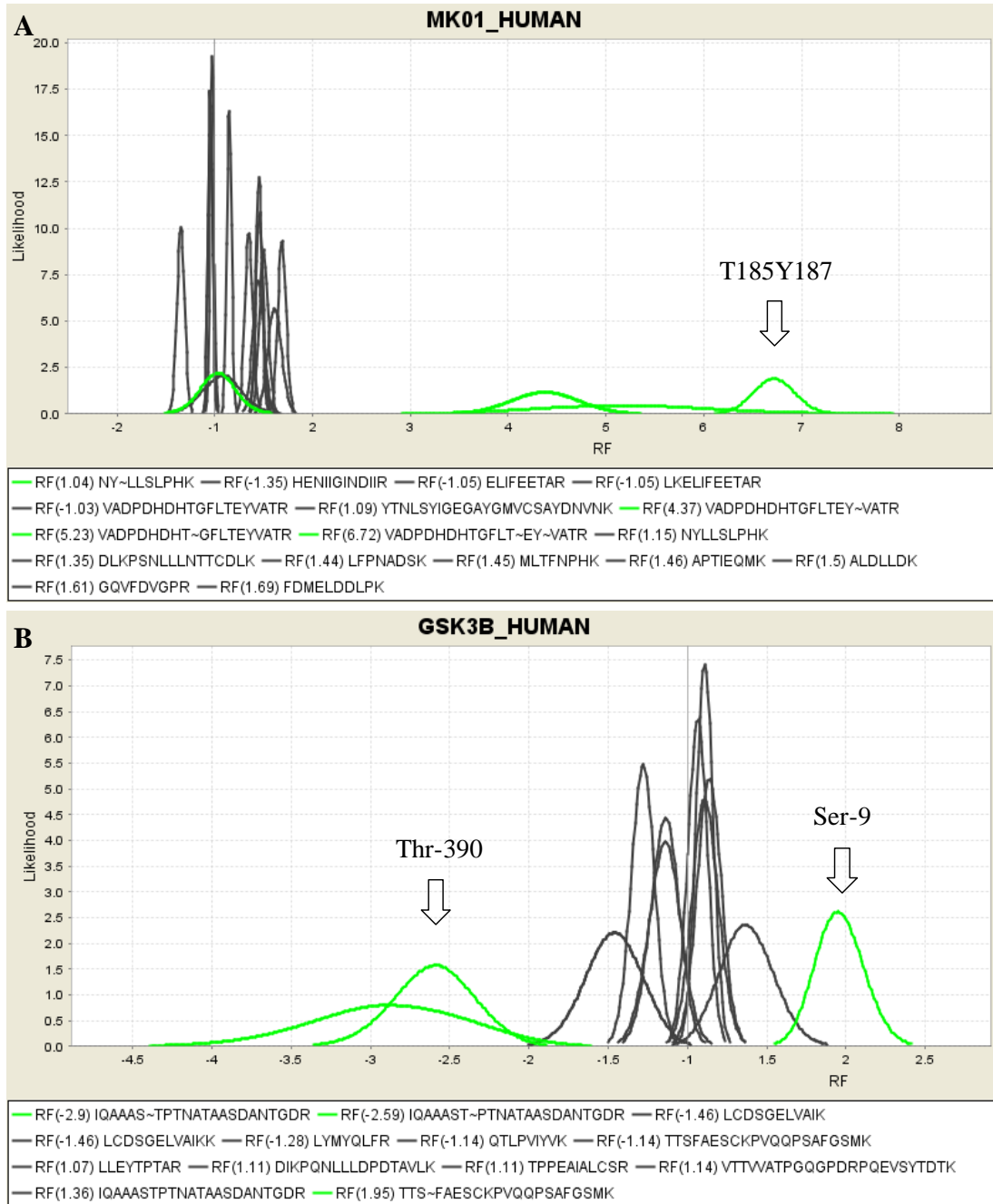
Die Veränderungen am Phosphorylierungsmuster konnten in zwei Kategorien eingeordnet werden. Von den 42 Phosphorylierungsstellen gehören lediglich 11 zu der Kategorie I, welche bereits bekannte und funktionell beschriebene Phosphorylierungsereignisse zusammenfasst. Zu dieser Kategorie gehören die Phosphorylierungen an MK01 (ERK2) (Abb. 4-21). Die Phosphorylierungsstellen pThr-185 und pTyr-187 definieren die Aktivierungsstellen, welche bereits in immunhistochemischen und Western Blot-Analysen im RCC nachgewiesen wurden [53,54,114]. Hingegen wirken die Phosphorylierungen Ser-9 und Thr-390 der Proteinkinase ‚Glycogen synthase kinase-3 beta‘ (GSK3B) inhibierend auf die Kinaseaktivität. Die beiden Phosphorylierungen an GSK3B werden unabhängig voneinander durch unterschiedliche Kinasen reguliert. Da die Modifikation an Thr-390 im Tumor in einer geringeren Menge vorlag als im gesunden Gewebe, wird in den untersuchten Tumorproben GSK3b nicht von p38 MAPK durch Phosphorylierung an Thr-390 inhibiert ( $RF_{Thr-390} = -2.59$ ) [115], sondern von der AKT Kinase am Ser-9 [116].

30 Phosphorylierungsstellen konnten der Kategorie II zugeordnet werden. Die identifizierten Phosphorylierungen sind zwar, bis auf drei Ausnahmen (PRKAG2 pSer-101; CAMK2B pSer-367 und CAMK2G pSer-381), in humanen Analysen beschrieben, aber funktionell nicht detailliert charakterisiert worden.

**Tab. 4-6: Regulierte Phosphorylierungen an Kinasen**

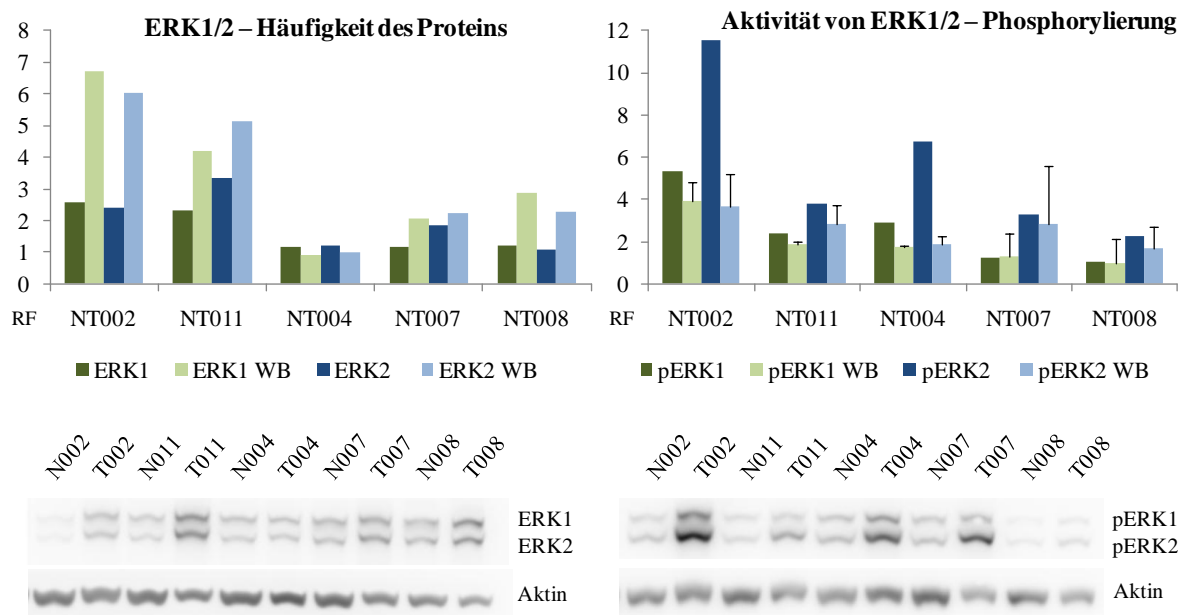
Kinase	P-Stelle	Peptidsequenz	Regulierung	Frequenz <sup>#</sup>	Referenz (PMID)
AAK1	S678	SATTPSPGS~PR	Hoch	4 / 5 <sup>-</sup>	
AAK1	T606	VQTT~PPPAVQGQK	Hoch	4 / 5 <sup>+</sup>	
AAK1	S623S624	VGS~LTPPS~SPK,			
AAK1	T620S624	2 Isomere	Hoch	5 / 5 <sup>-</sup>	
ABL2	S819/820	TVSTS~SQPEENVDR	Hoch	4 / 4 <sup>-</sup>	
KCC2B	S367	NSAAATS~PK	Runter	5 / 5 <sup>-</sup>	
KCC2D	S315S319	NFS~AAKS~LLK	Runter	3 / 4	
KCC2G	S311	GAILTTLVLS~R	Hoch	3 / 3 <sup>+</sup>	
KCC2G	T382/S384	GST~ESCNTTTEDEDLK,	Hoch	5 / 5 <sup>+</sup>	
KCC2G	S419	TAPSAGMQPQPS~LCSSAMR,	Hoch	5 / 5 <sup>+</sup>	
CDKL5	S343	SNS~KDIQNLVGLPR	Hoch	4 / 4	
GSK3A	S21 *	TSS~FAEPGGGGGGGGGGPGGSA	Hoch	4 / 4	Cross et al. (8524413)
GSK3B	S9 *	TTS~FAESCKPVQQPSAFGSMK	Hoch	4 / 4	Cross et al.
GSK3B	T390 *	IQAAAST~PTNATAASDANTGDR	Runter	5 / 5 <sup>-</sup>	Thornton et al. (18451303)
M3K2	S153 *	RLS~IIGPTSR	Hoch	4 / 5 <sup>+</sup>	Pearson et al. (16581779)
M4K4	S710*	SSS~KSEGPSQR	Hoch	3 / 4	Moritz et al. (20736484)
MK01	T185Y187*	VADPDHDHTGFLT~EY~VATR	Hoch	4 / 5 <sup>+</sup>	Lee et al. (18849062)
MK01	Y187 *	VADPDHDHTGFLTEY~VATR	Hoch	5 / 5	
MARK2	S400 *	SVS~ANPK	Hoch	4 / 5 <sup>+</sup>	Watkins et al. (19011111)
MARK2	S456	VPAS~PLPLER	Hoch	4 / 5 <sup>+</sup>	
PAK4	S142	FAGHS~EAGGGSGDR	Hoch	4 / 5 <sup>+</sup>	
PAK4	S181	RPLS~GPDVGTQPAGLASGAK	Hoch	5 / 5	
PCTK1	S110	KIS~TEDINK	Hoch	3 / 4	
PCTK1	S153 *	VS~LSEIGFGK	Hoch	4 / 4	Graeser et al. (12154078)
PCTK2	S165	LQINS~PPFDQPMR	Hoch	5 / 5 <sup>+</sup>	
PCTK3	S115	LQMES~PDLPLSLR	Hoch	3 / 3	
PCTK3	S12	RFS~LSVPR	Hoch	5 / 5 <sup>+</sup>	
PCTK3	S130	RAS~LSDIGFGK	Hoch	4 / 5 <sup>+</sup>	
PCTK3	S87	RFS~MEDVSK	Hoch	5 / 5 <sup>+</sup>	
PCTK3	S96	RLS~LPMDIR	Hoch	4 / 5	
KPBB	S27 *	SGS~VYEPLK	Hoch	3 / 3 <sup>+</sup>	Brushia et al. (10487978)
AAPK2	S377	MPPLIADS~PK	Runter	5 / 5 <sup>-</sup>	
AAKB1	S96 *	EVYLSGS~FNNWSK	Hoch	3 / 4	Woods et al. (12764152)
AAKG2	S101	TSPGS~PK	Hoch	3 / 4	
AAKG2	S196	IYASSS~PPDTGQR	Hoch	4 / 5 <sup>+</sup>	
KPCD1	S219 *	TSS~AELSTSAPDEPLLQK,	Runter	4 / 4 <sup>+</sup>	Rybin et al. (19029298)
KPCD1	S549	GSS~VGTGTNLHR	Runter	3 / 4	
RIOK2	S350	AEVYGS~ENESER	Hoch	3 / 4 <sup>+</sup>	
TNIK	S640	QNS~DPTSENPLPTR	Hoch	5 / 5 <sup>-</sup>	
TNIK	S680	TTSIS~PALAR	Hoch	4 / 5 <sup>-</sup>	

\* Phosphorylierungen, die bereits bekannt und funktionell beschrieben wurden. (Kategorie I)  
<sup>+</sup> verzeichnet im Bezug auf den chromophoben RCC Unterschiede in der Regulationsrichtung  
<sup>-</sup> gleiche Richtung der Regulation in chrRCC und ccRCC  
<sup>#</sup> Frequenz: Anzahl der RCC-Proben mit regulierter Phosphorylierung/ Anzahl der RCC-Proben in denen das phosphorylierte Peptid nachgewiesen wurde



**Abb. 4-21: Massenspektrometrische Quantifizierung der Phosphorylierungen von MK01 und GSK3B im klarzelligen Nierenzellkarzinom des Patienten 004.** Die grünen Likelihood-Kurven zeigen bei beiden Kinasen die wahrscheinlichsten Regulationswerte der phosphorylierten Peptide an (A) Während das modifizierte Peptid NYLLSLPHK nicht reguliert ist, hebt sich das Peptid mit der Phosphorylierung Thr-185Tyr-187 deutlich von den schwarzen Kurven der nicht-phosphorylierten Peptide ab. Mit einem pRF von 6.72 ist die Phosphorylierungsstelle deutlich reguliert und führt zur Aktivierung der MK01. (B) Bei GSK3B werden die gegensätzlichen Regulationen zweier phosphorylierter Peptide am Likelihood-Plot deutlich, deren Kurven signifikant von den nicht-regulierten und unmodifizierten Peptid-Kurven abweicht. Die Phosphorylierungen an Ser-9 und an Thr-390 sind bereits für ihre inhibierende Wirkung bekannt, werden jedoch durch unterschiedliche Kinasen reguliert.

Wie oben bereits beschrieben, kann ein unterschiedliches Phosphorylierungsmuster an Proteinkinasen mit einer verringerten oder erhöhten Aktivität einhergehen und durch eine veränderte Konformation zur Änderung der Affinität gegenüber dem Inhibitor führen. Die bei ERK1/2 (MK03/MK01) identifizierten Phosphorylierungen, pTyr-204 (MK03) und pThr-185/pTyr-187 (MK01), welche mit der Aktivität dieser Proteinkinasen einhergehen, korrelieren mit der Häufigkeit dieser Proteinkinasen im Tumor. Ähnlich wie von Lee et al. (2009) publiziert, war in auch in dieser Studie die Aktivierung von ERK1/2 mit einer niedrigen pT-Kategorie assoziiert. In den vorherigen Publikationen wurden aber keine Expressionsdaten der Proteinkinasen ermittelt und vergleichend hinzugezogen. Damit ließ sich nicht prüfen, ob es sich bei dem veränderten Proteinlevel um eine generelle Regulation handelte oder ob vielmehr die Bindungseigenschaft am Inhibitor durch die veränderte Aktivität beeinflusst wurde. Erste Western Blot-Analysen in dieser Arbeit zeigten eine erhöhte Proteinmenge von ERK1/2 im Tumorslysate und deuten darauf hin, dass es sich um eine generelle Regulation handelte und sich die Phosphorylierungen bzw. die Aktivität nicht unmittelbar auf das Bindungsverhalten auswirkten (Abb. 4-22).



**Abb. 4-22: Western Blot-Analyse von ERK1/2 zur Überprüfung der Regulationsfaktoren.** Im linken Diagramm wird die Häufigkeit der Proteinkinasen ERK1/2 anhand der ermittelten RF in der Kinomstudie (ERK1/2) und anhand der Western Blot-Analyse (ERK1/2 WB, n=1) abgebildet. Gerade bei den Patientenproben 002 und 011 wird deutlich, dass auch im Western Blot (links unten) eine erhöhte Proteinmenge im Tumorgewebe vorliegt. Die Beeinflussung der Affinität durch die Aktivierung von ERK1/2 (Phosphorylierung = pERK1/2) kann somit bei ERK1/2 ausgeschlossen werden, da bei den WB mit Gesamtlisat gearbeitet wurde. Der Western Blot (inkl. rechtes Diagramm, n = 2) bestätigt die Phosphorylierung von ERK1/2.

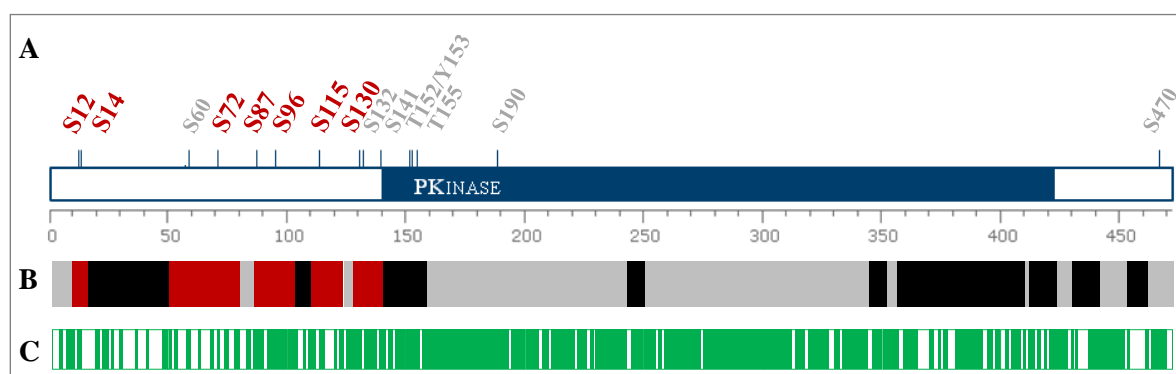


### PCTK3 repräsentiert eine regulierte Kinase auf Protein- und PTM-Ebene

PCTK3 gehört zu der Familie der CDC2-verwandten Serin/Threonin-Proteinkinasen und wurde in allen untersuchten Tumorgeweben als reguliert identifiziert. Diese Veränderungen betrafen sowohl die relative Menge des Proteins als auch die Phosphorylierungen.

Von insgesamt 15 bekannten Phosphorylierungsstellen, welche in der PhosphoSitePlus-Datenbank annotiert sind, konnten 7 identifiziert werden (Abb. 4-23 A). Die meisten der Phosphorylierungen befinden sich außerhalb der Kinasedomäne und sind bislang funktionell nicht charakterisiert.

Insgesamt konnten mehr als 50% der Aminosäuresequenz von PCTK3 durch Peptide abgedeckt werden. Diese Peptidsequenzen können exklusiv nur dieser Kinase und keinem anderen Eintrag in der gesamten Proteindatenbank zugeordnet werden. Dennoch fehlten vor allem Peptide der Kinasedomäne (Abb. 4-23 B). Neben PCTK3 gehören PCTK1 und PCTK2 zu der PCTAIRE-Familie, die bereits mit einer hohen Identität ihrer Sequenz von 80% beschrieben wurden [117]. Es wäre daher möglich, dass die generierten Peptide aus dieser Region keiner der PCTAIRE-Kinasen direkt zugeordnet werden können und somit aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Um diese Annahme zu prüfen wurde ein direkter Sequenzabgleich mit PCTK2/CDK17 (Abb. 4-23) durchgeführt. Die eingezeichneten, grünen Bereiche verweisen auf identische Aminosäuren, wobei vor allem der Bereich der Kinasedomäne eine sehr hohe Identität aufweist.

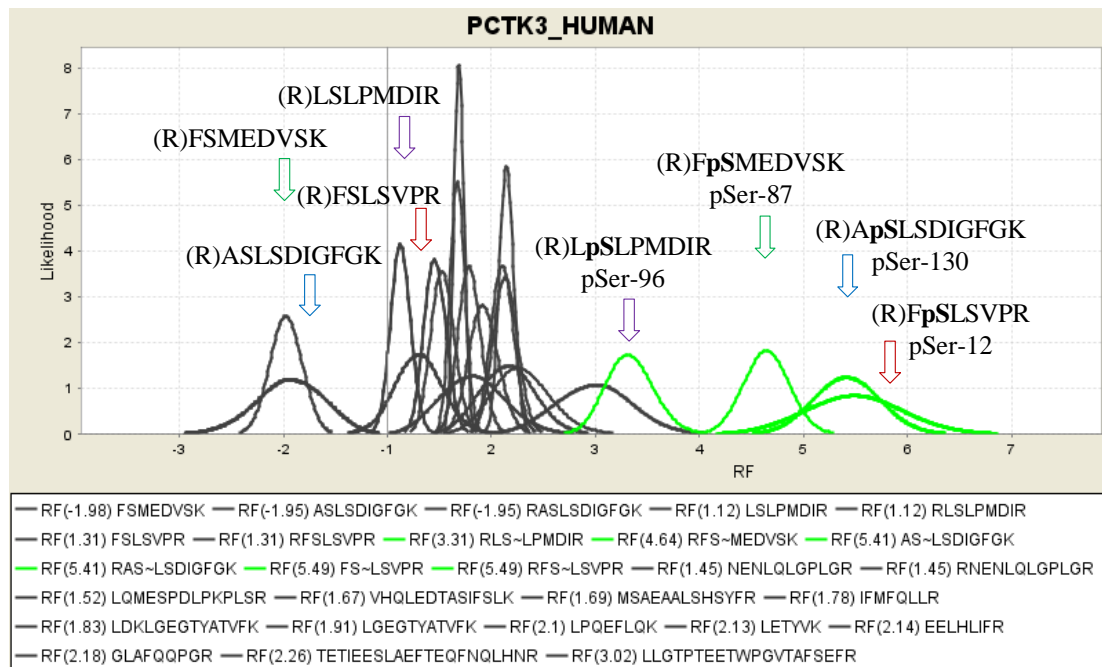


**Abb. 4-23: Peptidabdeckung der regulierten und phosphorylierten Kinase PCTK3.** (A) zeigt den Domänenaufbau inklusive aller in PhosphoSitePlus annotierten Phosphorylierungen. Rot hervorgehoben wurden die in den Studien identifizierten Phosphorylierungsstellen. (B) Proteinabdeckung anhand der identifizierten und eindeutig zu PCTK3 zugeordneten Peptide in Studie II (schwarze und rote Bereiche). Die roten Bereiche kennzeichnen wiederum zusätzlich Peptide mit Phosphorylierungen. (C) Sequenzvergleich mit PCTK2/CDK17, wobei grün markierte Bereiche identische Aminosäuren aufweisen. Im Bereich der Kinasedomäne sind die Übereinstimmungen sehr groß bzw. die Proteine zueinander nahezu identisch.



In Abbildung 4-24 wird repräsentativ der PCTK3-Likelihood-Plot aus dem Phospho-Kinom Profil des Patienten 004 näher betrachtet. Auf Basis der statistischen Auswertung sind vier hochregulierte Phosphorylierungen (grüne Kurven) sowie ein Cluster erkennbar, was auf eine generell erhöhte Menge von PCTK3 hinweist (RF= 1.84). Zusätzlich zu den regulierten Phosphorylierungen wurde eine Gegenregulation dokumentiert. Diese tritt bei dem korrespondierenden, nicht-phosphorylierten Peptid nur auf, wenn die Phosphorylierung einen erheblichen Teil der Gesamtpopulation umfasst.

Desweiteren wurde für PCTK3 eine entgegengesetzte Regulation im chrRCC zum ccRCC detektiert. Damit könnte diese Kinase einen tumorspezifischen Marker darstellen. Zur Validierung wäre ein breites, immunhistochemisches Screening notwendig, das PCTK3 über mehrere Gewebe hinweg auf die Spezifität gegenüber den unterschiedlichen RCC-Typen testet. Diese Analyse wurden bereits in Kooperation mit Herrn Prof. v. Wasielewski (Pathologisches Institut in der Deutschen Klinik, Bad Münden) gestartet. Bislang hat der PCTK3-Antikörper weder mit noch ohne thermische Vorbehandlung spezifisch gebunden. Daher sind weitere Optimierungsschritte notwendig, um von PCTK3 signifikante Signale zu erhalten und eine ccRCC-spezifische Regulation nachzuweisen.



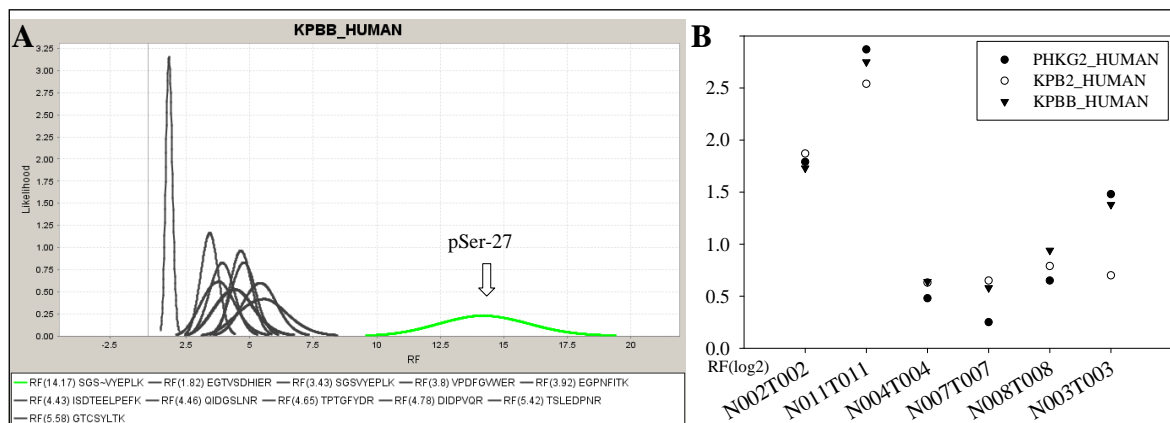
**Abb. 4-24: Massenspektrometrische Quantifizierung der Kinase PCTK3.** Der Likelihood-Plot dieser regulierten Kinase wurde aus den Daten des Phospho-Kinom-Profiles des Patienten 004 entnommen. Die einzelnen Kurven der Peptide bilden einen Hauptpeak, der signifikant positiv reguliert ist (RF=1.84). Die Tumore weisen starke Phosphorylierungen an diesem Protein auf, was durch grüne Kurven gekennzeichnet ist. Zu den regulierten P-Sites wurden in dem Likelihood-Plot zusätzlich die komplementären Peptide hervorgehoben.

## Einer der größten Proteinkomplexe konnte als stabiler Komplex mittels Kinase-selektiver Affinitätschromatographie identifiziert und charakterisiert werden

Die quantitative Analyse hatte zur erfolgreichen Identifizierung und Charakterisierung der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten der Phosphorylase-b-kinase (PhK) geführt. Damit war es möglich die Regulation eines der größten Komplexe der Proteinkinasen im RCC zu dokumentieren [118]. An die ATP-kompetitiven Inhibitoren, die bei der Kinase-Affinitätschromatographie eingesetzt wurden, konnte nur die katalytische Untereinheit (PHKG2) binden. Die regulatorischen Untereinheiten (KPB2-Alpha, KPBB-Beta, Calmodulin-Delta) besitzen keine Proteinkinasedomäne und konnten daher nur in Form eines stabilen Komplexes angereichert werden.

Gestützt durch die statistische Auswertung wurden Regulationsfaktoren bestimmt, welche auf eine generell erhöhte Menge der PhK hinweisen. Die Anreicherung des stabilen Komplexes wurden durch die annähernd identischen KRFs aller Untereinheiten der PhK bestätigt (Abb. 4-25).

Zusätzlich wurden im Tumorgewebe von drei Patienten (002, 008 und 011) die Phosphorylierung Ser-27 im Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Gewebe unterschiedlich reguliert identifiziert. Eine Phosphorylierung am Serin-27 der  $\beta$ -Untereinheit (KPBB), durch die cAMP-abhängige Proteinkinase PKA, kann die katalytische  $\gamma$ -Untereinheit aktivieren. Damit konnten neben der generellen Regulation auch Hinweise zur Aktivität der PhK im Nierenzellkarzinom erhalten werden.

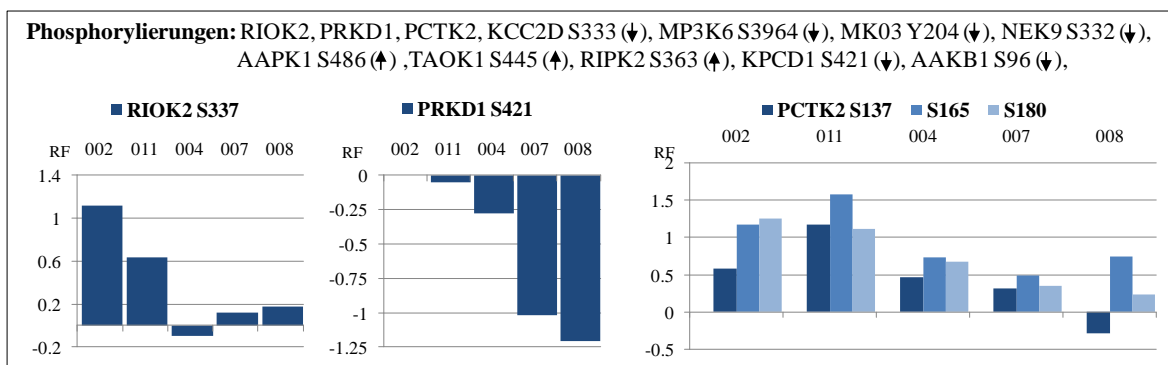


**Abb. 4-25: Regulatorische Information zur identifizierten Phosphorylase b Kinase (PhK).** (A) zeigt exemplarisch den Likelihood-Plot der regulierten Kinase KPBB im Kinom-Profil des Patienten 002 mit dem regulierten Peptid, das am Ser27 phosphoryliert ist (grüne Kurve) (B) Um einen Einblick über das gesamte Protein zu erlangen, wurden die RFs (log2) der PhK-Untereinheiten für jeden Patienten gegeneinander aufgetragen. Die Stabilität des Komplexes wird durch die nahezu identischen RF-Muster ersichtlich, wobei die Kinase aus dem Tumor der Patienten 002 und 011 die stärkste Regulation aufwies.

#### 4.4.5 QUANTITATIVE KINOM-ANALYSE ZUR IDENTIFIZIERUNG VON STADIEN-SPEZIFISCHEN VERÄNDERUNGEN IM RCC

Neben der Charakterisierung regulierter Kinasen, die Veränderungen im RCC unabhängig der Stadien kennzeichnen, wurde eine Stadien-spezifische Betrachtung der Regulationsfaktoren, sowohl der Kinasen als auch der Phosphorylierungen, durchgeführt. Dabei erfolgte die Einteilung der Kinasen, basierend auf deren KRFs, in vier Gruppen (Abb. 4-27). Die ersten beiden Gruppen beinhalten Kinasen, die in den früheren Entwicklungsstadien (Stadium II, pT2 Kategorie) deutlich stärker reguliert waren und deren Regulation im Laufe der Tumorentwicklung abnahm. Kinasen, deren Regulationsfaktoren korrespondierend zu den Stadien ansteigen, wurden in die Gruppen 3 und 4 eingeteilt. Diese Stadien-spezifische Auswertung beinhaltete auch Kinasen, die sich bereits durch eine signifikante Regulation in allen fünf ccRCC kennzeichneten. Die in Gruppe 4 eingeteilten Kinasen CDK2 und MET verzeichneten ihren höchsten KRF im Tumor 008 mit dem höchsten pT-Status (pT4) und Differenzierungsgrad. Hingegen wurden PCTK3 und PhK der Gruppe 1 zugeordnet, weil ihre höchsten Regulationen mit dem Stadium II assoziiert war und sich ihr KRF im weiteren Verlauf der Stadien verringerte. Neben den KRFs wurden auch bei Phosphorylierungen stadienabhängige Veränderungen beobachtet, dokumentiert und in Abbildung 4-26 dargestellt.

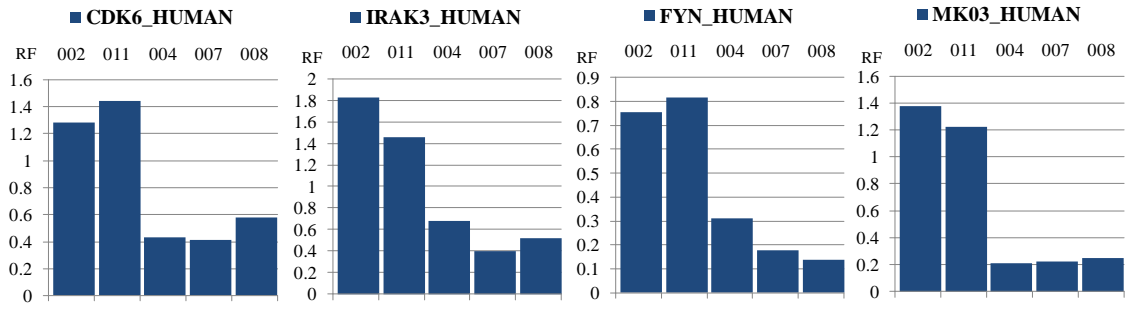
Die Ergebnisse der Stadien-spezifischen Analyse können auf Grund der geringen Anzahl der Tumorproben nicht als repräsentativ betrachtet werden. Die zugeordneten Kinasen sollen vielmehr Hinweise auf entwicklungsrelevante Ereignisse, wie Wachstum, Proliferation oder Invasion und Metastasierung, liefern und damit die Basis für weitere zukünftige Untersuchungen legen.



**Abb. 4-26: Stadien-spezifische Betrachtung der Regulierungen bei Phosphorylierungen.** Jedes Diagramm zeigt exemplarisch eine Phosphorylierungsstelle und deren RF bei den Patienten 002, 011, 004, 007 und 008. Die Reihenfolge korreliert mit den Tumorstadien (II, II, III, IV (G2), IV (G2-3)). Die Regulationsrichtungen wurden mit einem Pfeil gekennzeichnet.

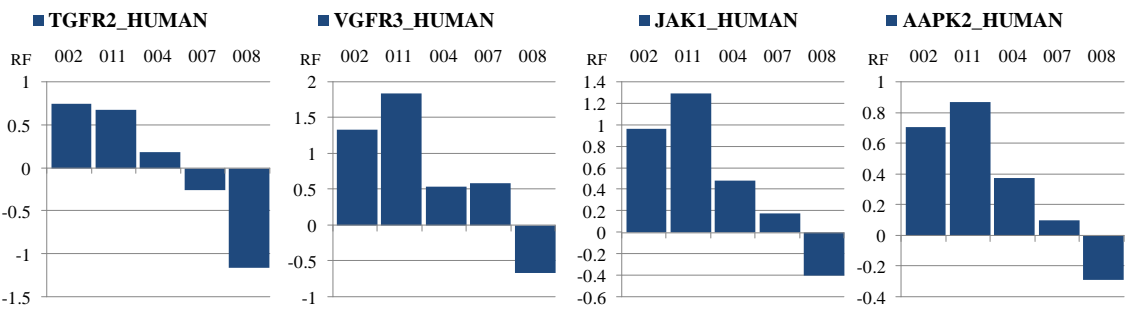
**Gruppe 1:** Höchste KRFs im Stadium II (pT2-Kategorie)

**Kinasen:** CDK6, IRAK3, FYN, MK03, PCTK3, KPBB, KPB2, PHKG2, MP2K6, MP2K2, M3K3, MP2K1



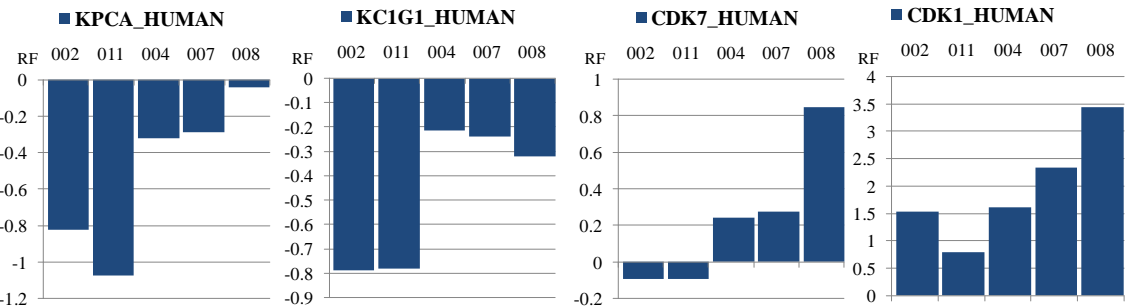
**Gruppe 2:** Höchste KRFs im Stadium II, Abnahme der KRFs korreliert zu Stadien und Differenzierungsgrad

**Kinasen:** TGFBR2, VGFR3, JAK1, AAPK2, KPCD1, AAKB2, PFTK1, KGP1A, TIE2, KIT, (LRRK2, CDK4)



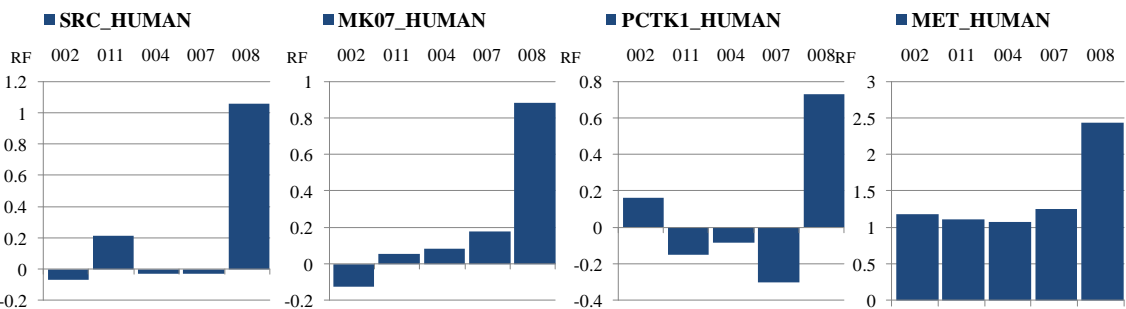
**Gruppe 3:** niedrigste KRF im Stadium II, Zunahme der KRFs korreliert zu Stadien und Differenzierungsgrad

**Kinasen:** KPCA, KC1G1, CDK7, CDK1, EPHA7



**Gruppe 4:** Höchster KRF bei Tumor 008 mit pT4-Kategorie und dem höchsten Differenzierungsgrad

**Kinasen:** SRC, MK07, PCTK1, MET, DYR1A, CDK2, RIPK2, CHKB, PK3CD

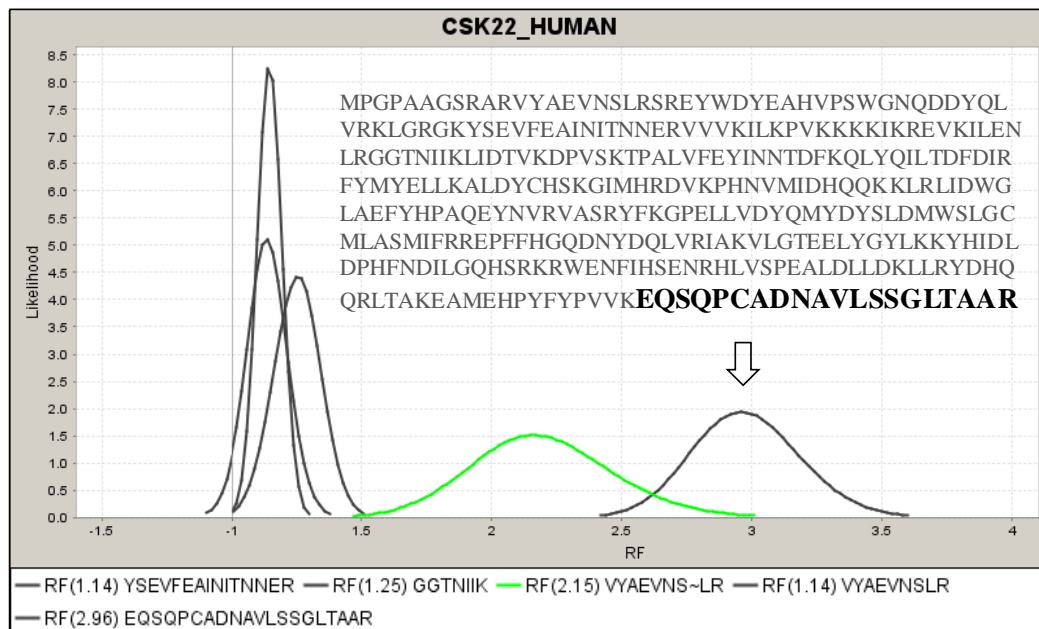


**Abb. 4-27: Stadien-spezifische Betrachtung der Regulierungen bei Kinasen.** Je nach Definition der Stadien-spezifischen Veränderungen wurden Kinasen in eine der vier Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 und 2 zeigt KRFs die sich im Verlauf der Tumorentwicklung verringern. In Gruppe 3 und 4 wurden Kinasen eingeordnet, die sich durch einen Anstieg der KRFs im Verlauf der Stadien kennzeichnen. In jeder Gruppe werden vier Kinase exemplarisch graphisch mit ihren RF für die Patienten 002, 011, 004, 007 und 008 dargestellt. Die Reihenfolge von links nach rechts wurden entsprechend der pT-Kategorien (Tumorstadien) und dem Differenzierungsgrad gewählt pT2 (II) G2, pT2 (II) G2, pT3a (III) G2, pT3b (IV) G2 und pT4 (IV) G2-3.

#### 4.4.6 WEITERE MODIFIKATIONEN

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse des Kinoms im RCC können nicht nur Hinweise auf Protein- und Phosphorylierungs-bezogene Veränderungen geben, sondern auch auf Splicevarianten oder Deletionen hinweisen, denn für jedes einzelne Peptid wurden auf Basis der jeweiligen iTRAQ-Reporterintensitäten mit Hilfe von iTRAQassist statistisch abgesicherte Regulationswerte berechnet. Treten dabei abweichende Regulationswerte bei einem einzelnen Peptid auf, könnte die Ursache dafür eine Modifikation sein.

Bei der katalytischen Untereinheit, alpha', der Caseinkinase 2 wurde in allen Tumorproben eine Stadien- und RCC-Typ-unabhängige Veränderung beobachtet. Dabei hob sich das Peptid EQSQPCADNAVLSGLTAAR im Likelihood-Plot deutlich vom Peptid-Hauptcluster ab (Abb. 4-28). Dieses im Tumor stark hochregulierte Peptid erwies sich nach Sequenzabgleich als C-Terminus der 41,2 kDa großen Proteinkinase. Für CSK21 (Caseinkinase 2 alpha) wurde bereits eine Deletion des C-Terminus beschrieben und funktionell charakterisiert [119-123]. Das Fehlen des C-Terminus im normalen Gewebe würde die Regulation erklären. Inwiefern der C-Terminus für CSK22 funktionell relevant ist und die physiologischen Prozesse des Tumors beeinflusst, müssten weitere Analysen prüfen.



**Abb. 4-28: Ein abweichend reguliertes Peptid der Kinase CSK22 in den Tumorproben.** Der Likelihood-Plot stammt aus dem Kinase-Profil des Patienten 003 und zeigt ein abweichend reguliertes Peptid, dessen Aminosäuresequenz dem C-Terminus zugeordnet werden kann. Der Plot steht dabei repräsentativ für alle untersuchten Tumore. Die mögliche Deletion des C-Terminus ereignete sich bei allen Stadien und Karzinomtypen.

## 5. DISKUSSION

### 5.1 KINASE-SELEKTIVE PROTEOMIK ALS BASIS ZUR CHARAKTERISIERUNG DES KINOMS HUMANER KREBSGEWEBE

Das Nierenzellkarzinom wurde bereits in mehreren RNA/DNA-Analysen u.a. mittels Microarrays [63,124-128] oder durch Methoden der Proteomik, wie 2D-Gele und iTRAQ-basierter Massenspektrometrie untersucht [99,129-133]. Zwei Faktoren erschwerten aber die Detektion und Charakterisierung der Kinasen in diesen vorherigen Studien: Zum einen zeichnen sich Kinasen weniger durch eine starke Expression aus, sondern vielmehr durch eine strikte Kontrolle ihrer Aktivität und Interaktionsfähigkeit etwa durch PTMs. Zum anderen bilden Kinasen zwar die größte Proteinfamilie, repräsentieren jedoch mit ihren 500 Mitgliedern nur ca. 2% aller theoretisch vom Genom kodierten Proteine. Das bedeutet, dass für die Untersuchung und Charakterisierung des Kinoms im Nierenzellkarzinoms eine Anreicherung notwendig ist.

#### 5.1.1 WIE SYSTEMATISCH LASSEN SICH KINASEN AUS EINEM GEWEBE IDENTIFIZIEREN?

Im ersten Schritt der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob Kinasen unter Verwendung chemischer Proteomik direkt aus Gewebelysat angereichert werden können. Die Methodik basiert auf immobilisierte, niedermolekulare ATP-kompetitive Inhibitoren als Kinase-spezifische Liganden [82,111]. Um innerhalb einer biologischen Fragestellung eine möglichst umfassende Analyse von Kinasen durchzuführen, werden Inhibitoren verwendet, die Kinasen selektiv, aber unspezifisch binden [84,134]. Zwei der ATP-kompetitiven Inhibitoren Purvalonol B und V16743, die in diesem Zusammenhang bereits im Zellliniensystem angewendet wurden [83,110], sollten nun erstmalig in dieser Arbeit an *ex-vivo* Gewebe getestet werden. Bei V16743 handelt es sich um ein Pyrido[2,3-d]-Pyrimidin Derivat, welches ursprünglich aus PP58 entwickelt worden ist [85]. Diesem Inhibitor wurde der Dichlorphenylring entfernt, um sich sterisch optimal in Kinasen mit großen Gatekeeper-Aminosäuren einzulagern, was theoretisch die Möglichkeit bieten sollte, ca. 70% aller Kinasen, die solch eine Aminosäure in der Öffnung ihrer ATP-Binderegion besitzen, abzudecken [37]. Auf Grund von zell- und gewebespezifischen Expressionsunterschieden ist eine Identifizierung aller im humanen Genom kodierten Kinasen jedoch nicht zu erwarten [64]. Innerhalb dieser Promotionsarbeit wurden dennoch

durch V16743 zusammen mit Purvalanol B ca. 40% der rund 500 bekannten humanen Proteinkinasen aus Tumor- und gesundem Nierengewebe angereichert, die sich annähernd über alle Gruppen des gesamten Kinoms verteilen. Damit gehört diese Arbeit zu einer der umfangreichsten proteomischen Analysen, in denen humane Kinasen effizient aus einem komplexen Gewebelysat isoliert, durch massenspektrometrische Sequenzierung identifiziert und nachfolgend charakterisiert werden konnten. Rikova et al. (2007) konnte mittels phosphotyrosin-spezifischer Antikörper über 50 Tyrosin-Kinasen in humanen Lungentumoren analysieren [77]. In dieser Arbeit wurden zusätzlich zu 54 Proteinkinasen, die Tyrosine phosphorylieren können, über 130 Serin-/Threoninkinasen identifiziert.

Die Ausbeute und Abdeckung angereicherter Kinasen könnte sich jedoch noch erhöhen, wenn mehrere, in Reihe geschaltete Inhibitoren eingesetzt werden würden. Mit der seriellen Verwendung von fünf verschiedenen Inhibitoren konnten in einer Arbeit, die zur Charakterisierung an Zellzyklus beteiligter Kinasen und Phosphorylierungen diente, bereits 219 Proteinkinasen aus Hela S3 Zellen angereichert werden [82].

### **Einfluss zellulärer Faktoren auf das Bindungsverhalten der Kinasen**

Bei der vergleichenden Analyse, der an den Inhibitoren gebundenen Kinasen, sollten auch intrazelluläre Faktoren berücksichtigt werden (Abb. 5-1). Der Großteil der in unterschiedlichen Mengen nachgewiesenen Kinasen wird auf eine veränderte Expression und des damit einhergehenden mRNA- bzw. Proteinlevels zurückzuführen sein. Dennoch kann die Affinität einer Kinase zu einem ATP-kompetitiven Inhibitor durch weitere Faktoren beeinträchtigt werden. Bei der Verwendung chemischer Proteomik sollte daher beachtet werden, dass RCC-spezifische Veränderungen an Kinasen und Phosphorylierungen nicht nur auf die Expressionen zurückzuführen sind, sondern auch durch Kinase-spezifische Faktoren, wie Interaktionsfähigkeit und Aktivität.

Ungefähr 50% der identifizierten Kinasen des Nierenzellkarzinoms waren bei dieser Studie mit phosphorylierten Peptiden (n=357) assoziiert. Differenzielle Phosphorylierungen könnten die Sensitivität einer Proteinkinase gegenüber dem ATP-kompetitiven Inhibitor verändern, indem sie durch eine Konformationsänderung die Interaktionsfähigkeit oder die Aktivität einer Kinase beeinflussen. Deshalb sollte geprüft werden, inwiefern RCC-spezifische Regulationen der Proteinkinasen mit den detektierten und differenziell regulierten Phosphorylierungen zusammenhängen. Von den 42 regulierten Phosphorylierungsstellen wurden acht bei Kinasen beobachtet, die ebenso stadienunabhängige Veränderungen in der Proteinhäufigkeit aufwiesen (PCTK3, M4K4,

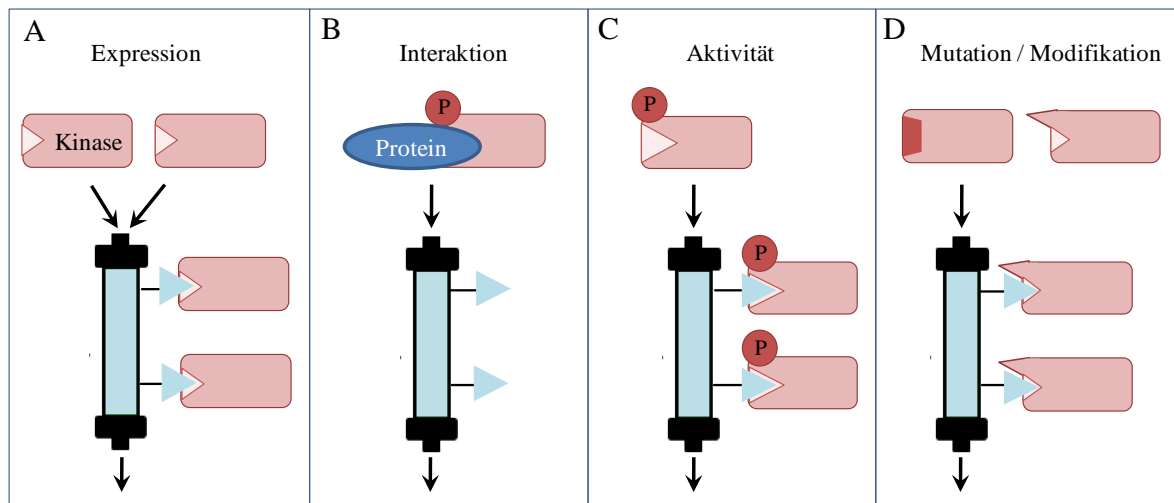
RIOK2 und KPBB). Zudem wurden an der Aktivierungsstelle von MK01/MK03 (ERK2/1) stadienspezifische Veränderungen im ccRCC dokumentiert. Dabei korrelierten die höchsten KFRs mit den niedrigen pT-Stadien (Stadium II). Western Blot Analysen mit Phospho- bzw. Protein-spezifischen Antikörpern gegen ERK1/2 und PCTK3 wurden mit Gesamtzelllysat durchgeführt und vergleichend zu den in der quantitativen Analyse ermittelten KRFs hinzugezogen (Abb. 4-19, Abb. 4-22). Die Veränderungen von PCTK3 sowie den beiden MAP Kinasen konnten, durch das Ergebnis der Western Blot-Analysen, den RCC-spezifischen Regulationen zugeschrieben werden und nicht der veränderten Bindungseigenschaft zum Inhibitor.

Auch die Bindung eines Interaktionspartners könnte eine Kinase für den Inhibitor sterisch zugänglicher oder unzugänglicher werden. Drei Proteinkomplexe von Kinasen wurden detektiert, darunter war die Phosphorylase-B-Kinase (PhK) als Einziges reguliert. Alle drei identifizierten Komponenten der PhK wiesen in der Auswertung vergleichbare KRFs auf. Da nur die katalytische Untereinheit PHKG2 in der Lage ist, an den ATP-kompetitiven Inhibitoren zu binden, mussten die regulatorische  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheit (KPB2/KPBB) durch ihre starke Interaktion zur PHKG2 festgehalten worden sein. Formieren sich mehrere Einheiten zu einem funktionellen Komplex könnte die Bindung zum Inhibitor unterstützt werden. Die PhK der Tumoren könnte aber ebenso verstärkt am Inhibitor gebunden haben, weil durch die Phosphorylierung am Serin-27 der  $\beta$ -Untereinheit, welches durch die cAMP-abhängige Proteinkinase PKA phosphoryliert wird, die katalytische  $\gamma$ -Untereinheit aktiviert wurde [118]. Ob und inwiefern die Bindung oder Aktivität neben den RCC-spezifischen Veränderungen Anteil an der erhöhten Menge im Tumorgewebe hat, konnte bislang nicht festgestellt und somit ausgeschlossen werden.

Bei Phosphoproteom-Analysen humaner Kinasen, die an Zellkultursystemen durchgeführt wurden, konnte kein Einfluss auf das Bindungsverhalten dokumentiert werden. Eine kurzzeitige InlB<sub>321</sub>- bzw. HGF-vermittelte Stimulation (3,6 und 20 min) der MET-Signalkaskade änderte bei den Kinasen zwar das Phosphorylierungsmuster, jedoch nicht ihre Affinität zu den verwendeten Inhibitoren [85]. Mutationen und Modifikationen die Einfluss auf die Struktur einer Kinase haben, sollten als ein weiterer wichtiger Aspekt im Zusammenhang mit der Affinität der Kinasen zum Inhibitor genannt werden, denn auch Mutationen an Kinasen können dazu beitragen, dass kritische Wasserstoffbrückenbindungen zum Inhibitor nicht mehr ausgebildet werden. So verursachte die Gatekeeper-Mutation T531I des BCR-ABL1-Fusionsproteins bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie oder der Aminosäureaustausch T670I bei KIT im gastrointestinalen



Stromatumor eine Imatinib-Resistenz [135,136]. Die Gatekeeper-Aminosäuren sind dabei entscheidend für die Bindung der Typ-I und -II Inhibitoren, aber nicht für die Interaktion mit ATP. Das ist auch der Grund dafür, weshalb diese Art der Mutation zwar das Potential der Inhibitoren verringert, aber keine Änderungen der Kinase-Aktivität nach sich zieht [22,31]. Mutationen selbst sind in einer proteomischen Studie schlecht zu detektieren und können von Mascot keinem Protein zugeordnet werden. Eine parallele DNA-Sequenzierung könnte die Mutationen identifizieren. Basierend auf der vorhergesagten Aminosäure-Sequenz könnte das Peptid mit der Mutation durch Tandem-MS identifiziert werden.



**Abb. 5-1: Einfluss zellulärer Faktoren auf das Bindungsverhalten der Kinasen an ATP-kompetitive Inhibitoren.** Am Beispiel einer Affinitätschromatographie mit einem immobilisierten ATP-kompetitiven Inhibitor (blaues Dreieck) werden Parameter, die die Bestimmung RCC-spezifischer Regulationen von Kinase beeinflussen können, gezeigt. (A) Während die KRFs des Tumorgewebes im Vergleich zum gesunden Nierenparenchym in erster Linie Expressionsunterschiede der Kinasen innerhalb beider Gewebe repräsentieren, könnten (B/C) Phosphorylierungen (P) eine Konformationsänderung auslösen und die Interaktionsfähigkeit oder die Aktivität einer Kinase beeinflussen und ggf. die Bindung zum Inhibitor verändern. Vor allem eine veränderte Aktivität im Gewebe könnte die Sensitivität einer Kinase gegen das ATP-Analoga erhöhen. (D) Führt eine Mutation oder Modifikation, wie Deletion oder Splicevarianten, innerhalb der Kinase zur Veränderung der ATP-Bindungstasche könnte eine Bindung am Inhibitor vermindert oder wie am Beispiel der Modifikation gesteigert werden.

Ebenso könnten aber auch Sequenzmodifikationen die Bindungseffizienz zum Inhibitor beeinflussen. Innerhalb dieser Arbeit wurde durch die Analyse einzelner Peptide eine Veränderung am C-Terminus von CSK22 dokumentiert (Abb. 4-28). Dafür könnten mehrere Ursachen in Frage kommen. Neben einer Deletion, kann es sich auch um eine translationale oder posttranslationale Abspaltung handeln. CSK22 bildet zusammen mit CSK21 die zwei katalytischen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\alpha'$  der Caseinkinase 2, die bereits im Zusammenhang mit Tumorgenese beschrieben wurde [137]. Bei CSK21 ist bekannt, dass

die Deletion des C-Terminus die enzymatische Aktivität reduziert [122] und auch die thermische und proteolytische Stabilität erhöht [121]. Möglicherweise hat die Deletion des C-Terminus an CSK21 ebenfalls Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms. In Zusammenarbeit mit der Strukturbiologie könnte eine mögliche Konformationsänderung und diesbezüglich eine veränderte Sensitivität gegenüber den Inhibitor aufgeklärt werden.

Bislang gibt es aber noch keine konkreten experimentellen Hinweise darauf, dass die in dieser Arbeit beobachteten differentiellen Regulationen durch die aufgeführten Faktoren beeinflusst werden. Wenn sich zukünftig jedoch durch weitere Untersuchungen bei einigen Kinasen herausstellen sollte, dass sich die RCC-spezifischen Veränderungen der Kinasen nicht wie erwartet auf Expressionunterschiede bzw. auf verschiedene Proteinlevel zurückführen lassen, sondern vielmehr auf derer Modifikationen oder Mutationen, würde dies wichtige und hilfreiche Hinweise zum Bindungsverhalten der Kinase liefern. Unterschiede im Aktivitäts- bzw. Konformationsstatus einer Kinase können auch die Affinität zum klinisch-relevanten Inhibitor beeinflussen und über Erfolg und Misserfolg einer Therapie entscheiden.

### 5.1.2 GEWEBESPEZIFISCHE PARAMETER DEFINIEREN DIE PROTEOMSTRATEGIE

In den letzten Jahren wurde bei vielen systematischen Analysen, darunter Genexpressionsstudien [138-140] oder Proteomstudien basierend auf 2D-GE oder quantitativer Massenspektrometrie [99,130,132,141] der Vorteil genutzt, dass mittels einer Nephrektomie sowohl genügend Material vom RCC als auch vom gesunden korrespondierenden Gewebe erhalten werden konnte. Neben der Gewinnung von genügend Ausgangsmaterial ist es wichtig, dass sich beide Gewebe gut voneinander abgrenzen.

Bei der Operation eines Magenkarzinoms findet ebenfalls meist eine teilweise (4/5) oder vollständige Magenentfernung statt. Zusätzlich würde die Assoziation mit *Helicobacter pylori* gerade auf dem Gebiet der Infektionsforschung einen interessanten Aspekt darstellen [142]. Dennoch wurde von den in dieser Studie beteiligten Pathologen, auf Grund der schwierigen optischen Unterscheidung bzw. der bestehenden Vernetzung von Tumor- und gesundem Gewebe, von einer Analyse des Magenkarzinoms abgeraten.

Bei anderen Tumoren, z.B. Gehirntumoren, wäre lediglich ein Vergleich zwischen verschiedenen Subtypen möglich, da eine Entfernung von gesundem „frischem“ Gewebe nicht durchgeführt werden kann. Daher bildete das Nierenzellkarzinom eine ideale Grundlage für die durchgeführten Analysen.

In dieser Studie konnten Kinasen nicht nur erfolgreich angereichert werden, es war auch möglich, sie relativ zu quantifizieren und Veränderungen zu dokumentieren. Die Möglichkeit, dabei beide Gewebeproben von einem Patienten zu entnehmen und zu vergleichen, erweist sich als Vorteil gegenüber dem Zellkultursystem. Kinasen, deren Regulationen auf den individuellen Patienten und dementsprechend nicht auf Tumor-assoziierte Veränderungen zurückzuführen sind, würden dadurch automatisch innerhalb der Analyse ausgeschlossen. Gleiches gilt für geschlechts- und altersabhängige Aspekte, denn nur wenn konsistente Veränderungen bei den Kinasen über alle fünf Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom hinweg dokumentiert wurden, erfolgte eine Zuordnung zu ccRCC-assoziierten physiologischen Prozessen und veränderten Signalwegen. Diese Auswertung umfasste desweiteren generelle entwicklungs- und differenzierungs-unabhängige Ereignisse, da die fünf untersuchten ccRCC einen Querschnitt über drei Stadien hinweg (II, III und IV) bildeten.

Um zusätzlich einen Einblick über die Spezifität der Änderungen im ccRCC zu erhalten, wurden die Analyse-Ergebnisse des einzigen chromophoben Tumors (chrRCC) vergleichend hinzugezogen. Die Clusteranalyse zeigte bereits eindeutig, dass sich die beiden RCC-Typen in ihren KRFs unterscheiden. Weisen Kinasen im chrRCC die gleiche Regulationsrichtung wie im ccRCC auf, könnte es sich tendenziell um generelle Tumorprozesse handeln. Darunter fielen u.a. die Kinasen CDK2, STK4, RSK2 (KS6A3), die Phosphorylase b Kinase, EPHB2 und PDXK, die damit entweder am Wachstum und der Entwicklung des Nierenzellkarzinoms (klarzelligen und chromophoben Typ einschließend) oder an Krebs im Allgemeinen beteiligt sein könnten. Treten Unterschiede der beiden Subtypen auf, wie bei den Kinasen KIT, PCTK3, HCK, DMPK, LRRK2 und STK33, vergrößert sich die Wahrscheinlichkeit, dass diese bei einem ccRCC-spezifischen Ereignis involviert sind. Diese Kinasen könnten perspektivisch als Biomarker fungieren oder eine spezifische Therapie ermöglichen, die sich spezifisch gegen den klarzelligen RCC richtet.

Insbesondere c-KIT (auch CD117) scheint im chromophoben RCC abweichend von ccRCC reguliert zu sein. Die Überexpression dieses Rezeptors wurde sowohl in dieser Arbeit (Abb. 4-20) als auch bereits durch Genexpressionstudien und immunhistochemische Verfahren beschrieben [143-145]. Damit könnte KIT auf Grund seiner tumor-spezifischen Expression bei immunhistochemischen Färbungen eingesetzt werden und dazu beitragen, die einzelnen RCC-Karzinomtypen voneinander zu unterscheiden.

### **Proteomische *ex-vivo* Analysen bilden komplexe tumorphysiologische Prozesse ab**

Die Expression aber auch die Aktivität der Kinasen könnte durch verschiedene gewebespezifische Faktoren beeinflusst und verändert werden. Daher ist es notwendig, die physiologischen Parameter des Tumorgewebes zu berücksichtigen. Einer dieser Faktoren, die Vaskulogenese bzw. die Angiogenese, spiegelte sich in der Aufbereitung der Gewebeproben vom Tumorgewebe und korrespondierendem, gesunden Nierenzellparenchym wider. Die deutliche Rotfärbung der Tumorlysate ist ein Anzeichen für die Ausbildung neuer Blutgefäßstrukturen zur Versorgung des Tumors mit Nährstoffen sowie Wachstumsfaktoren und Hormonen. Diese extrazellulären Signale können unmittelbar die Aktivität zellulärer Prozesse und Signalwege beeinflussen und die Umstrukturierung der Genregulation auslösen. Welchen Einfluss diese Faktoren ausüben könnten, wird an der Studie von Moschella und Kollegen (2003) deutlich, die aufzeigt, dass bei *ex-vivo* kultivierten Nierenzellkarzinom-Zellen im Vergleich zu dem Original-Tumorgewebe Unterschiede in den Genexpressionsprofilen auftraten [146].

Das bedeutet aber auch, dass bei diesen Arbeiten die Wachstumsfaktoren, die von den Tumorzellen exprimiert werden, auf das gesunde Gewebe wirken können und beachtet werden sollten. Lenburg et al. (2003) ermittelte mit seinen Microarray-Studien nicht nur Genexpressiondaten von Tumorgeweben, sondern betrachtete auch die Patientenvariationen [147]. Dazu wurden jeweils die Expressionswerte der Tumorproben und der dazugehörigen normalen Gewebe ermittelt und mit den Daten, die beim Vergleich der Tumorproben mit jedem anderen normalen Gewebe dokumentiert wurden, verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Genexpressionsprofile der Tumorgewebe ähnlicher zu ihrem eigenen, umgebenden Gewebe als zu den anderen gesunden Geweben der Patienten waren. Diese Patienten-spezifischen Differenzen sollen auf Umwelt- und genetische Faktoren zurückzuführen sein. Auch wenn dies die wahrscheinlichste Ursache darstellt, sollte in Betracht gezogen werden, dass der Tumor mit seinen Wachstumsfaktoren das umgebende gesunde Gewebe und dessen zellphysiologische Prozesse beeinflussen könnte.

Auch in dieser Arbeit kann es möglich sein, dass das gesunde Gewebe durch den Tumor in der Expression von Kinasen beeinflusst wurde. Die statistischen Analysen zeigen jedoch, dass kaum Unterschiede im Proteinlevel der Kinasen zwischen den gesunden Gewebe auftraten (Abb. 4-14), weder bei Geweben deren Tumoren zwei verschiedenen Stadien angehören (Tumoren der Patienten 008 (IV) und 011 (II)), noch bei unterschiedlichen RCC-Typen (klarzelliger Tumor bei Patient 002 und chromophober Tumor des Patienten

003). Dieser Punkt ist besonders interessant, weil die durchgeführte Clusteranalyse (Abb. 4-15) daraufhin hinweist, dass zwischen den beiden Kinase-Regulationsprofilen der verschiedenen RCC-Typen deutliche Unterschiede vorliegen.

In Gewebe-Mikroarrays von Nierenzellkarzinomen wurde die Expression des Insulin-like Wachstumsfaktors I (IGF-1) bei 82,1% der ccRCC aber nur bei 36% der chrRCC nachgewiesen [148]. Aber auch die Expression von Rezeptoren, welche die extrazellulären Signale aufnehmen, verarbeiten und zur Steuerung zellulärer Prozesse ins Zellinnere weiterleiten, können Hinweise auf vorhandenen Wachstumsfaktoren in der Umgebung liefern. Während der Rezeptor KIT eine Überexpression im chromophoben Tumor aufweist [143], wurde für den Rezeptor CSF1R eine RNA-Überexpression bei 51% der ccRCCs beobachtet, bei chrRCC lag der Wert lediglich bei 8% [149]. Auf Grund dieser Studien könnte davon ausgegangen werden, dass beim chromophoben RCC andere Wachstumsfaktoren im umliegenden Gewebe vorliegen und damit auch das gesunde Gewebe auf eine andere Art und Weise beeinflusst wird. Bislang wurde der Einfluss der Tumorphysiologie auf das Nierenparenchym nicht untersucht und auch die Clusteranalysen und Boxplots dieser Promotionsarbeit geben bislang keinen Hinweis darauf.

### 5.1.3 TRANSLATIONALE ASPEKTE DER KINOMANALYSE

In dieser Arbeit konnten Kinasen effizient aus humanem Gewebe angereichert und charakterisiert werden. Zudem wurden bei der Bestimmung RCC-spezifischer Regulationen automatisch Gewebe- und zellphysiologische Parameter einbezogen. Die Veränderungen spiegeln somit die Situation im erkrankten Gewebe wider, wie sie bei einer Behandlung vorgelegen hätten. Diese Arbeit zeigt aber auch zwei translationale Aspekte der chemischen Proteomik bzw. Kinomik auf: die Analyse der Selektivität klinisch-relevanter Inhibitoren auf der einen Seite und die Definition Patientenspezifische Resistenzen gegenüber therapeutisch eingesetzten Inhibitoren auf der anderen Seite.

#### **Charakterisierung der Selektivität klinischer Wirkstoffe**

Kinasen direkt aus einem Zielgewebe anzureichern, eröffnet für den therapeutischen Einsatz die Möglichkeit, Einblick über die tatsächliche bzw. individuelle Selektivität der Inhibitoren zu erhalten und Ursachen für vorhandene Nebenwirkungen zu charakterisieren.

Die ursprüngliche Intention der translationalen Medizin war es Kinaseinhibitoren für die Blockierung einzelner Kinasen in veränderten Signalwegen zu entwickeln. Allerdings

wurde noch Jahre nach der Zulassung klinisch-relevanter Inhibitoren in Untersuchungen der Selektivität mitunter ein breiteres Kinase-Spektrum als bislang angenommen beobachtet. Ein methodischer Ansatzpunkt zur Analyse der Selektivität sind dabei Studien mit rekombinant hergestellten Proteinkinasen und *in-vitro* Proteinkinase- oder Bindungsassays. Diese Analysen umfassten erste und wichtige Schritte, um die Bindungspartner, das Verständnis der Bindung und die Affinität von über 50% der im humanen Genom kodierten Kinasen zu charakterisieren [150,151]. Ein Nachteil solcher Arbeiten ist jedoch die fehlende Berücksichtigung zellphysiologischer Faktoren wie Expression, Aktivität oder Interaktionspartner der Kinasen, denn wie bereits ausgeführt können diese Kriterien die Bindung an den Inhibitor beeinflussen. Daher wurde der Ansatz auf Untersuchungen möglicher Bindungspartner eines Inhibitors mit Methoden der chemische Proteomik erweitert [80]. In *in-vitro* Studien mit verschiedenen Zelllysaten wurden immobilisierte Kinaseinhibitoren in Kombination mit der Peptidsequenzierung zur Charakterisierung bindender Substrate angewandt [111,152]. Für Imatinib wurden dabei neben den bereits bekannten Substratproteinen ABL/BCR-ABL und ARG zwei weitere Bindungspartner identifiziert, die Rezeptor-Tyrosinkinase DDR1 und die Quinon Oxidoreduktase NQO2 [153]. Obwohl die bisher umfangreichste Analyse von Karaman et al. (2008) mit rekombinanten Kinasen weitere Bindungspartner (wie KIT und die PDGFR Rezeptoren) aufzeigt, wurden NQO2 bzw. DDR1 nicht oder nur mit einer schwachen Bindung identifiziert [151]. Schon hieraus wird ersichtlich, dass in der Auswertung und Festlegung der Selektivität, zellphysiologische Faktoren mit einbezogen werden müssen. Untersuchungen, bei denen zusätzlich Kinasen direkt aus dem zu behandelnden Gewebe analysiert werden können, ermöglichen diese Berücksichtigung zell- und gewebe-spezifischer Expressionsunterschiede sowie differenziellen Bindungsverhaltens. Damit könnten neben der Erweiterung der Selektivität spezielle Bindungsprofile direkt aus dem Zielgewebe bestimmt werden, was helfen könnte, die Wirkstoffe oder die Behandlung zu optimieren und unerwünschte Interaktionen und Nebenwirkungen zu minimieren.

### **Verständnis über Resistenzmechanismen gegenüber klinischen Wirkstoffen**

Mit den erstellten Bindungsprofilen könnte nicht nur die Selektivität eines Inhibitors geprüft werden, sondern auch nachfolgend dessen Effizienz im zu behandelnden Gewebe. Eine verminderte Affinität von bekannten Bindungspartnern gegenüber dem Inhibitor könnte Hinweise auf Expressionsunterschiede, Modifikationen, Aktivitätsänderungen oder Mutationen einer Kinase liefern, die sich in der Therapie als Gewebe- bzw. Patienten-spezifische Resistenzen bemerkbar machen.

### **Translationale Aspekte im Hinblick auf die untersuchten Nierenzellkarzinome**

Bei der zielgerichteten Therapie des Nierenzellkarzinoms mit den Kinaseinhibitoren Sorafenib, Sunitinib und Temsirolimus wurde ein signifikanter Anstieg der durchschnittlichen Überlebensrate von Wochen bzw. Monaten und eine verbesserte Verträglichkeit im Vergleich zu anderen therapeutischen Ansätzen dokumentiert. Dennoch sind die Medikamente nicht frei von Nebenwirkungen und die Antwortrate variiert in Abhängigkeit der Patienten [102,103].

In dieser Studie wurde einzig mTOR als Substrat von Temsirolimus [58] und VEGFR3 als Substrat von Sorafenib [154] identifiziert und quantifiziert. mTOR wurde nur in Studie III detektiert und ist beim Tumor des Patienten 008 hochreguliert. VEGFR3 (VGFR3) wurde anhand der KRFs bereits bei den Stadien-spezifischen Regulationen erwähnt und in die Gruppe 2 eingeordnet. Die KRFs dieser Rezeptor-Tyrosinkinase nahmen kontinuierlich bei Tumoren mit höheren Stadien ab. Bei dem Tumor des Patienten 008 verringerte sich sogar das Proteinlevel von VEGFR3 im Vergleich zum gesunden Gewebe. Bei einem therapeutischen Ansatz wäre theoretisch Temsirolimus effizienter als Sorafenib, wenn man sich allein diese beiden Kinasen betrachtet. Das würde bedeuten, dass eine Resistenz gegenüber Sorafenib nicht ausgeschlossen werden kann. Da der Patient 008 aber bereits vor einer möglichen Therapie verstarb, können die hier vorliegenden Daten und Hypothesen nicht überprüft werden.

Gegen die wenigsten Kinasen mit RCC-spezifischen Regulationen sind bislang therapeutische Arzneistoffe beschrieben bzw. entwickelt worden. Zu insgesamt 8 Kinasen (CDK1, CDK2, c-KIT, c-MET, CSF1R, GSK3B, PK3CD und PRKD1) konnten mit Hilfe der ‚Therapeutic Target Database (TTD)‘ (<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/TTD.asp>) [155,156] sowie GeneGo (<http://www.genego.com/>) Informationen zu Medikamenten (Inhibitoren), deren Wirkung und dem Einsatzgebiet erhalten werden. Einige der Medikamente befinden sich in Arzneimittelstudien, wie z.B. AT7519 in Phase I/II bei Non-Hodgkin’s Lymphdrüsenkrebs [157,158] oder P276-00 in Phase I/II bei Knochenmark-, Hals- und Nackenkrebs [159,160]. Die beiden Wirkstoffe richten sich gegen Zellzyklus-Kinasen speziell gegen CDK1 bzw. CDK2. Möglicherweise sind gerade diese Inhibitoren auch für die Behandlung von Nierenzellkarzinom geeignet, denn bei diesen beiden Kinasen, vor allem bei CDK1, korrelieren die Regulationen mit den höheren Stadien bzw. mit den Tumoren, die bereits Metastasen ausgebildet haben (Tumoren der Patienten 007 und 008).

Insgesamt wurden bei ungefähr 50 Kinasen Veränderungen hinsichtlich ihrer Häufigkeit und dem Phosphorylierungsmuster detektiert (Abschnitt 4.4.4). Sie können nach weiteren Untersuchungen dazu dienen, neue therapeutische Ansatzpunkte zu entwickeln bzw. vorhandene Inhibitoren auf ihre Wirksamkeit hin im RCC zu überprüfen.

## **5.2 KINOM-BASIERTE PROZESSE UND SIGNALWEGE IM NIERENZELLKARZINOM**

### **5.2.1 CHARAKTERISIERUNG UND EINORDNUNG VERÄNDERTER KINASEN IM RCC**

#### **Kategorie I**

Kategorie I beinhaltet die Kinasen, die bereits im Zusammenhang mit dem Nierenzellkarzinom beschrieben wurden. Die dieser Kategorie zugeordneten Kinasen wurden durch verschiedene Methoden der Genom- und Proteomforschung (cDNA Mikroarray, Western Blot-Analysen, 2D-Gelelektrophorese und LC-MS/MS,) im RCC untersucht. Dabei konnten Veränderungen hinsichtlich ihres mRNA- und/oder ihres Proteinlevels im RCC nachgewiesen werden. Darunter waren auch die Rezeptorkinase CSF1R, die durch das Proto-Onkogen *c-fms* kodiert wird, sowie die Pyruvatkinase Isozym M1/M2 (PKM2), M4K4 und LRRK2 zu finden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurden sie in vorherigen Publikationen mit einer erhöhten Expression im RCC identifiziert [133,140,149,161-163]. Die mit veränderter Häufigkeit detektierten Proteinkinasen MET und PK3CD, sowie die Untereinheiten der AMP-aktivierten Proteinkinase und ERK2, deren Phosphorylierungsstatus sich im Tumor änderte, können bereits in RCC-beteiligte MET-, MAPK- oder mTOR-Signalwegen zugeordnet werden [46,138,164-168].

Einige Kinasen, wie HCK, FGR und PCTK3, wurden teilweise nur einmalig in Hochdurchsatz-Verfahren, wie Genexpressionsstudien, im Zusammenhang mit RCC identifiziert [20,63,128]. Leider fehlen bislang funktionelle Charakterisierungen, bei denen idealerweise die Veränderungen direkt an *ex-vivo* bzw. *in-vivo* Analysen validiert wurden.

#### **Kategorie II & III**

Ungefähr die Hälfte der regulierten Kinasen wurde in der vorliegenden Arbeit in Kategorie II eingruppiert. Darunter waren z.B. BTK und LIMK1, die im Zusammenhang mit Lymphdrüsenkrebs bzw. Brustkrebs beschrieben worden sind [169,170]. Bei den Zyklus-abhängigen Kinasen CDK1 und CDK2 erfolgte die Zuordnung in Kategorie II auf Grund



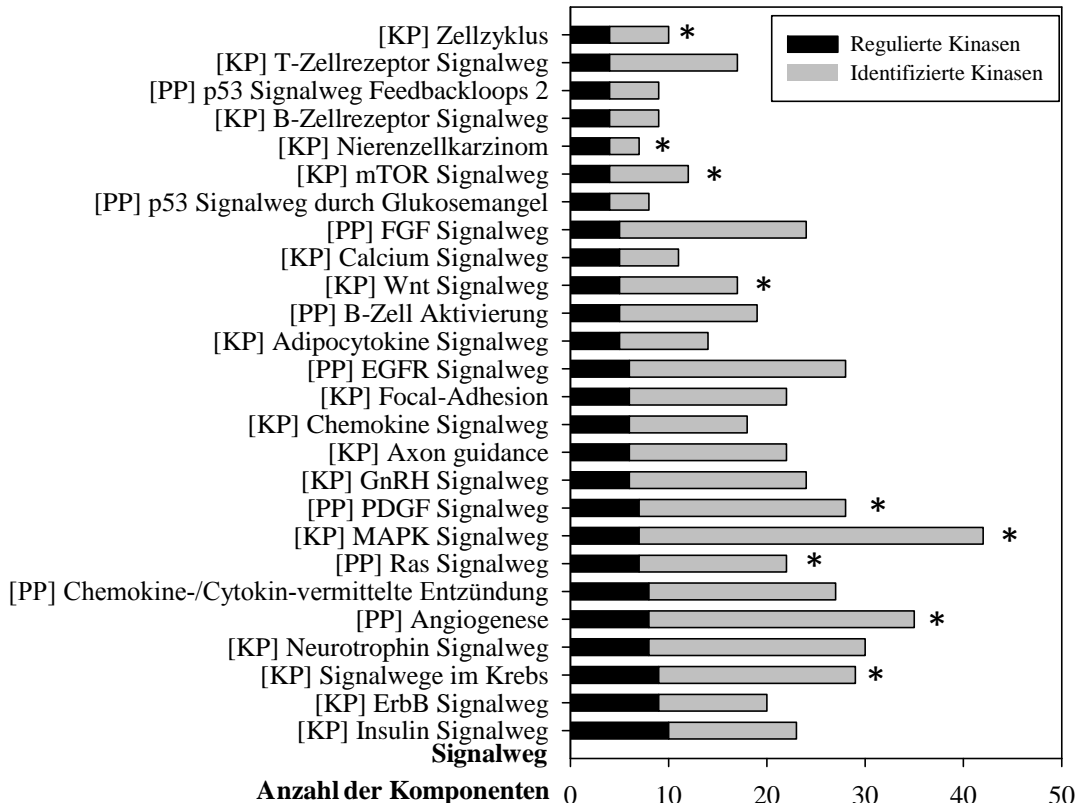
der Tatsache, dass ihre Beteiligung an der Tumorgenese und den damit einhergehenden physiologischen Veränderungen bereits gezeigt wurde [171,172]. Die in soliden Tumoren veränderte Zellteilung und die unkontrollierte Proliferation werden oftmals durch deregulierte Zellzyklus-Kinasen verursacht, die wichtige Regulatoren der Zellzyklus-maschinerie darstellen [159,173]. Bis jetzt gibt es keine Publikation in der Veränderungen in Expression oder Häufigkeit von CDK1 und CKD2 im RCC beschrieben wurden. Beide Kinasen werden lediglich im Zusammenhang mit dem klinisch-relevanten Agens Triptolide genannt, das die Expression dieser Kinasen erniedrigt und dadurch das Tumorwachstum reduziert [174]. Der Vergleich mit anderen Krebsarten dient aber nicht nur zur Einordnung der Funktion, sondern kann auch Hinweise auf die Ursache der Deregulation liefern, wie im Fall des Rezeptors EphB2 und der Kinase MK10 (JNK3). Beide Kandidaten zeigten eine Verminderung des Proteinlevels im RCC-Tumorgewebe und wurden bereits in anderen Krebsarten als Tumorsuppressoren oder im Zusammenhang mit Apoptose beschrieben [175-178]. Während Deletions, Missense- und Nonsense-Mutationen von EphB2 in Prostatazelllinien und klinischen Tumorproben nachweisbar waren [179], wurde bei MK10 in Lymphdrüsen-, Magen- und Leberkrebs-Zelllinien die Expression durch eine Methylierung des bidirektionalen Promotors unterdrückt [180]. Ob im Nierenzellkarzinom ebenfalls genetische oder epigenetische Mechanismen ursächlich an der verringerten Expression dieser Kinasen beteiligt sind, muss durch entsprechende Analysen geprüft werden. Hier könnte eine Zusammenarbeit der Bereiche Proteomik, die den Phänotyp aufzeigt und Genomik, welche den Genotyp in der Tumorzelle charakterisiert, zur weiteren Aufklärung der molekularen Mechanismen dieser Erkrankung beitragen.

Auch Kinasen, die der Kategorie III zugeordnet wurden, können wertvolle Hinweise zum Verständnis des RCC liefern. Proteine dieser Kategorie zeichnen sich dadurch aus, dass sie bisher in keiner Publikation in Bezug zu einer Krebserkrankung- oder entwicklung beschrieben worden sind. Am Beispiel von RIOK2 lässt sich jedoch ihre Relevanz verdeutlichen. Diese atypische Serin-/Threonin-Kinase ist an der späten Reifung der 40S ribosomalen Untereinheit und der 18S rRNA beteiligt und stellt damit einen Bestandteil der Ribosomenbiogenese und der Translationsmaschinerie dar [181,182].

### **Zuordnung der regulierten Kinasen zu bereits bekannten Signalwegen**

Die Einordnung der Verknüpfungen, Funktionen und Auswirkungen von Kinasen im Kontext mit Zellwachstum, Proliferation, Angiogenese und weiteren Prozessen der

Tumorgenese hilft, das Wissen über Kinasen im Nierenzellkarzinom zu erweitern. Durch die Web-basierte Analyse der regulierten Kinasen mittels DAVID konnte ein erster Eindruck beteiligter Signalwege gewonnen werden (Abb. 5-2). Neben dem mTOR-Signalweg wurde auch der WNT-, PDGF- und MAPK-Signalweg aufgelistet. Diese Signalwege sind bereits dafür bekannt, im Nierenzellkarzinom dereguliert zu sein [46] und physiologische Prozesse wie Angiogenese oder Zellzyklus zu beeinflussen, welche ebenfalls durch regulierte Kinasen vertreten waren.



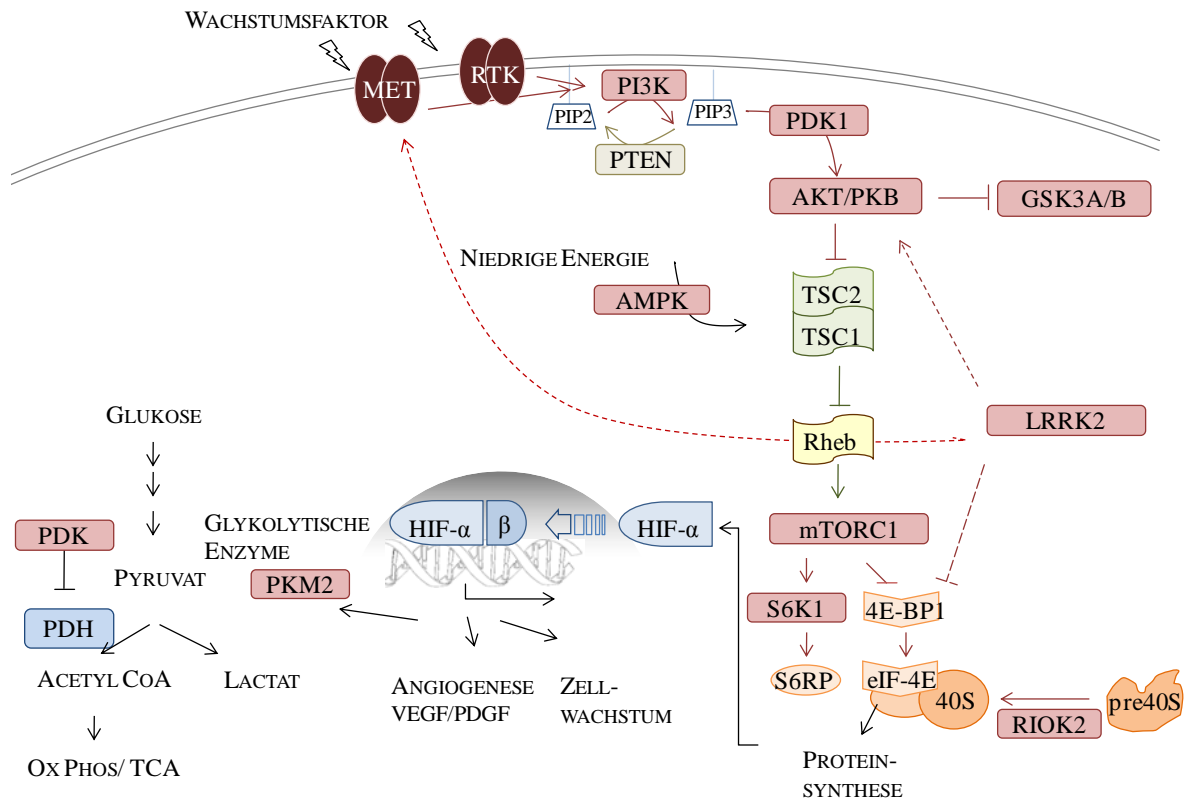
**Abb. 5-2: Zuordnung der identifizierten Kinasen zu bekannten Signalwegen unter Verwendung von DAVID** (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Dabei wurden die Kinasen mit der KEGG- bzw. Panther-Datenbank (KP und PP) abgeglichen. Um zu bestimmen, wie groß der Anteil der regulierten Kinasen bei diesen Signalwegen war, wurden alle identifizierten Kinasen vergleichend hinzugezogen. \* weist auf die Signalwege hin, die im Kontext mit RCC bereits beschrieben wurden.

### Einordnung regulierter Komponenten in den mTOR- und VHL-Signalweg

Der mTOR Signalweg wird über die Aktivierung von AKT durch PI3K gesteuert. Die regulierte Proteinkinase LRRK2, die erst vor kurzem im Zusammenhang mit RCC publiziert wurde, könnte eine direkte oder vorgeschaltete Komponente dieses deregulierten Signalweges darstellen (Abb. 5-3). Während im papillaren RCC die mTOR-Signalkaskade von LRRK2 durch deren Liganden-unabhängige Aktivierung der Rezeptor-Tyrosinkinase MET beeinflusst wird [162], konnte im Zusammenhang mit der Parkinson-Erkrankung gezeigt werden, dass LRRK2 direkt die Phosphorylierung und Aktivierung (Ser-473) von AKT vermittelt [183]. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die eIF4E-vermittelten

Proteintranslation, wobei LRRK2 den negativen Regulator 4E-BP phosphoryliert. Nach der Ablösung des hyperphosphorylierten 4E-BP von eIF4E, kann der eukaryotische Translationsinitiationskomplex geformt werden. Für diesen Komplex, der für die Translation der Proteine notwendig ist, wird u.a. die 40S ribosomale Untereinheit benötigt, wodurch wiederum eine Verbindung zu R1OK2 geknüpft werden kann. Möglicherweise führt die gesteigerte Protein-Biosynthese zu einem erhöhten Bedarf an der 40S UE, dessen Reifung und der daran beteiligten Kinase R1OK2.

Neben der Protein-Biosynthese wird auch der Stoffwechsel einer Tumorzelle durch den mTOR-Signalweg beeinflusst. In Kombination mit dem VHL-Signalweg trägt dieser dazu bei, dass der Transkriptionsfaktor HIF akkumuliert und die Transkription von über 100 Zielgenen im Nierenzellkarzinom induziert wird. Darunter fallen Proteine, die an den Prozessen der Glukoseaufnahme und der Verminderung des TCA (‘Tricarbonsäure Zyklus’) beteiligt sind, sowie Enzyme der Glykolyse [184]. Äquivalent zu Sauerstoffmangel, wird dadurch der sogenannte Warburg Effekt initiiert, welcher den Wechsel des zellulären Metabolismus zur anaeroben Energiegewinnung durch Gärung beschreibt [185,186]. Eines der beteiligten glykolytischen Enzyme, PKM2, wurde auch in dieser Studie mit einer erhöhten Menge im Tumorgewebe identifiziert [187,188]. In diesem Zusammenhang müssen auch die Kinasen Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 2 und 3 (PDK2 / PDK3), erwähnt werden, welche in dieser Arbeit mit einer geringeren Menge im RCC im Vergleich zum gesunden Gewebe detektiert wurden. Dem Warburg Effekt entsprechend wird der Substratzufluss in den TCA-Zyklus durch die PDK minimiert, indem es die Phosphorylierung und Inaktivierung der Pyruvatdehydrogenase (PDH) bewirkt. Somit widersprechen die hier vorliegenden Ergebnisse vorherigen Studien, in denen gezeigt wurde, dass PDK3 unter Hypoxie durch HIF1 $\alpha$  exprimiert wird [189]. Die Ursache hierfür könnte in der geringeren Affinität zum Inhibitor liegen. In diesem Fall sollte bei der Überlegung, PDK3 als therapeutisches Zielprotein zu nutzen, der perspektivische Inhibitor und dessen Affinität direkt unter Verwendung von RCC-Gewebe getestet werden. Zudem werden im Genom vier PDK-Isoformen kodiert, deren Expression gewebespezifisch variiert [190]. Möglicherweise tendiert die RCC-Tumorzelle unter Hypoxie zur Expression von PDK1, um den Warburg Effekt aufrecht zu erhalten und weniger zur Expression von PDK3. Diese Kinase wurde lediglich in der Studie mit den Patienten 008 und 011 detektiert. Mit zwei zugeordneten Peptiden handelte es sich zudem um eine geringe Abdeckung. Dennoch, und das spricht für die zweiten These, wurde PDK1 in beiden Patienten im Tumorgewebe mit einer erhöhten Häufigkeit identifiziert.



**Abb. 5-3: mTOR-Signalweg und die Glykolyse.** LRRK2 und R1OK2 wurden als neue mögliche Komponenten in den Signalweg integriert. LRRK2 soll sowohl 4E-BP1 phosphorylieren als auch AKT aktivieren. R1OK2 ist an der Reifung der 40S-UE beteiligt, welche beim Translationsinitiationskomplex mitwirkt. Beide Kinasen wären damit an der mTOR-initiierten Protein-Biosynthese beteiligt. Durch die Deregulation des mTOR-Signalweges kommt es zudem zur Akkumulation von HIF, welches den Warburg Effekt u.a. mit der erhöhten Expression von PKM2, bewirkt. Entgegen dem Warburg-Effekt wurden die Isotypen 2 und 3 der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase, PDK, welche den Substratzufluss in den TCA-Zyklus durch Phosphorylierung und Inhibierung der Pyruvatdehydrogenase (PDH) minimieren soll, in reduzierter Menge im Tumor detektiert.

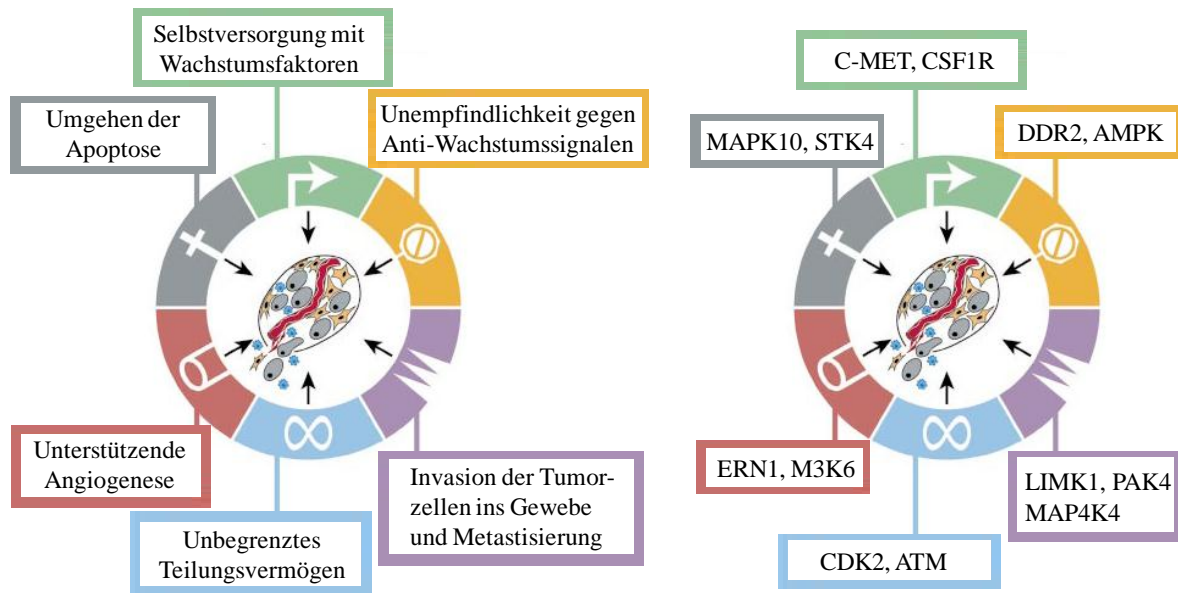
### Einfluss RCC-spezifische Kinase-Regulation in tumorphysiologischen Prozessen

Die Kennzeichen von Krebs, die sich den Veränderungen physiologischer Prozesse widerspiegeln, gehen oftmals mit der Deregulation involvierter Signalwege einher. HIF, als Bestandteil des VHL- und mTOR-Signalweges, dient dabei nicht nur als Regulator des Stoffwechsels, sondern auch der Sauerstoffversorgung, indem er die Expression von Angiogenese fördernde Faktoren, wie VEGF und PDGF initiiert. Um die Adaptation der Tumorzellen an die Hypoxie zu minimieren und das Tumorwachstum zu beeinflussen, wurden therapeutisch wirksame mTOR- und VEGFR-Inhibitoren entwickelt. Zwei weitere Kinasen könnten perspektivisch interessante, therapeutische Zielproteine darstellen. Ihre Wirkung im physiologischen Prozess der Angiogenese wurde in vorangegangenen Studien näher untersucht. M3K6, eine hochregulierte Kinase, scheint dabei unabhängig von HIF an

der VEGF-initiierten Angiogenese involviert zu sein, da ein Knockdown von M3K6 das Tumorwachstum hemmt. Dabei wurde eine geringe Dichte von Blutgefäßen und eine Erniedrigung der basalen VEGF Expression unter Sauerstoffmangel und unter normalen Konditionen verzeichnet [191]. Dagegen scheint ERN1, ein endoplasmatischer Stresssensor, oberhalb von HIF zu agieren und einen Regulator der VEGF-Expression unter Hypoxie und Glukosemangel repräsentieren [192].

Ein weiteres, von Hanahan et al. [3] beschriebenes Schlüsselmerkmal der Tumorzellphysiologie ist die Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren (Abb. 5-4). Wachstumsfaktoren selbst wurden in dieser Studie nicht charakterisiert. Dennoch lassen sich anhand der Kinasen, speziell von Rezeptoren, Rückschlüsse über dieses Merkmal ziehen. Durch die in den drei Studien erhöhte Präsenz des Rezeptors MET könnten die Krebszellen eine Art Hypersensitivität gegenüber dem Wachstums- und Scatterfaktor, HGF/SF, entwickeln und dadurch den Ras-Raf-MAPK- oder die PI3K/AKT-Signalweg aktivieren. Es wäre daher denkbar, dass die Phosphorylierung und Aktivierung von ERK bzw. die Inhibierung von GSK3A/B an pSer-21/pSer-9 [116] durch den MET-Signalweg ausgelöst wurde. Hier stellt sich die Frage, ob sich in den ermittelten Daten weitere veränderte Kinasen finden, deren Phosphorylierungen auf die HGF-vermittelte MET-Signalkaskade zurückzuführen sind. Ein Abgleich mit bislang unveröffentlichten Daten einer Phosphoproteom-Analyse humaner Kinasen der HGF-aktivierten MET-Signalkaskade (Dr. Tobias Reinl) deutet an, dass neben den bereits genannten Kinasen ERK1/2 und GSK3A/B auch eine veränderte Phosphorylierungsstelle an M4K4 (pSer710) durch HGF initiiert wird. Anhand einer anderen Studie mit Wortmannin, einem PI3K-Inhibitor, lässt sich zudem für M4K4 die vorgeschaltete Signalkaskade, der PI3K/AKT-Signalweg, zuordnen [193]. Auch bei der phosphorylierten Kinase PAK4 (pSer-142, pSer-182) konnte bereits durch eine frühere Publikation eine HGF-vermittelte Aktivierung über PI3K festgestellt werden, diese bislang jedoch ohne Phosphorylierungsstelle [194]. PAK4 bindet zudem an LIMK1, eine ebenfalls in dieser Studie identifizierten und regulierten Kinase, und kann diese, gezeigt an Prostatakrebszellen, in einer HGF-abhängigen Weise aktivieren [195,196]. Bei Betrachtung der Phosphorylierungsereignisse von GSK3A/B, M4K4, PAK4 aber auch LIMK1 (pSer-310) wird ersichtlich, dass die höchsten Phosphorylierungen mit dem höchsten KRF von MET assoziiert sind. Dieses Ergebnis betrifft die Tumorprobe von Patient 008, der bereits stark metastasiert hatte und einen höheren Differenzierungsgrad im Vergleich zu den anderen Tumorproben aufwies. Interessant ist die Einordnung von M4K4, PAK4 und LIMK1 in die zellphysiologischen Prozesse (Abb. 5-4) denn diese Kinasen kennzeichnen sich durch

ihren Einfluss auf die Invasion und Migration von Zellen [197-199]. Zudem wurde bei MET selbst, mittels immunhistochemischer Färbung, bei 45% der klarzelligen RCC eine Überexpression festgestellt, die aber zudem signifikant mit dem Differenzierungsgrad bzw. den Stadien korreliert ( $I < II < III < IV$ ) [166]



**Abb. 5-4: Veränderungen der Zellphysiologie modifiziert nach Hanahan et al., 2000 [3].** In der rechten Abbildung wurden Kinasen den auf der linken Seite aufgeführten zellphysiologischen Kennzeichen zugeordnet, wie der Rezeptor DDR2 und die Unempfindlichkeit gegenüber Anti-Wachstumsfaktoren. In Melanomazellen konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine Verringerung des Rezeptors der durch Fibrillarcollagen (FC) verursachte Zellzyklusarrest aufgehoben wird [202]. Möglicherweise wird im RCC der inhibitorische Effekt von FC auf das Wachstum und die Proliferation ebenfalls durch die reduzierte Häufigkeit des Rezeptors im Tumor umgangen.

Auch wenn MET, M4K4, PAK4 und LIMK1 über alle Stadien hinweg reguliert vorgefunden wurden, zeigen diese Kinasen bei dem am stärksten metastasierten Tumor eine Zunahme ihrer Protein- bzw. Phosphorylierungs-Regulationsfaktoren. Und obgleich die Stadien-spezifischen Veränderungen nicht repräsentativ betrachtet werden können, scheint es als ob es im Laufe der Nierenzellkarzinom-Entwicklung zu einer Verlagerung des Ras-Raf-MAPK- zum PI3K/AKT/mTOR-Signalweges kommt. Hierfür spricht, dass neben ERK1/2, die bekannte Komponenten der Ras-Raf-MAPK-Kaskade darstellen, zusätzlich auch ihre direkt vorgeschalteten Kinasen MP2K1 und MP2K2 mit einer abnehmenden Tendenz bezüglich ihrer Proteinmenge in den Stadien identifiziert wurden. Die Auswertung der Daten zeigt, dass die Studie neben Stadien-übergreifenden Veränderungen auch Hinweise auf entwicklungsrelevante Ereignisse liefern kann.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit dokumentiert eine experimentelle Strategie zur erfolgreichen Anreicherung und Charakterisierung von Kinasen aus *ex-vivo* Gewebe des Nierenzellkarzinoms. Durch die totale Nephrektomie wurde zudem eine vergleichende Analyse zum korrespondierenden gesunden Nierenparenchym ermöglicht. Bei insgesamt drei Proteomansätzen mit sechs Patienten wurden unter Verwendung der immobilisierten, niedermolekularen ATP-kompetitiven Inhibitoren V16743 und Purvalanol B 221 Kinasen, darunter mehr als 180 Proteinkinasen, angereichert und durch massenspektrometrische Sequenzierung identifiziert. Die quantitative Analyse der Kinasen erfolgte mittels iTRAQ-Markierung und gab Einblicke in RCC-spezifische Veränderungen. Die Verwendung einer 4plex-Markierung ermöglicht darüber hinaus den direkten Vergleich gesunder Gewebe zweier Patienten und damit wertvolle Einblicke in die Patientendiversität. Neben der effizienten Anreicherung und Analyse von Kinasen war es genauso wichtig, Veränderungen der Phosphorylierungsmuster zu charakterisieren, welche die Interaktionsfähigkeit und die Aktivität einer Kinase beeinflussen können. Für ca. 50% der identifizierten Kinasen wurden Information zum Phosphorylierungsstatus gewonnen.

Die quantitative Peptidsequenzierung führte, ausgehend vom erkrankten Gewebe und korrespondierendem gesunden Nierenparenchym eines Patienten, zur Bestimmung von Regulationsfaktoren jeder einzelnen identifizierten Kinase (KRF) und Phosphorylierungsstelle (pRF). Insgesamt wurden fünf klarzellige RCCs untersucht, die verschiedenen Stadien zugeordnet wurden. Damit bezogen sich die Ergebnisse, 33 in ihrer Häufigkeit veränderte Kinasen und 42 differenzielle Phosphorylierungen, auf generelle entwicklungs- und differenzierungs-unabhängige Ereignisse. Diese Veränderungen konnten Signalwegen oder tumorphysiologischen Prozessen zugeordnet werden und damit zum Verständnis der Entstehung und Entwicklung des RCC beitragen.

Die Auswertung der Regulationsfaktoren der Kinasen bestätigt, dass der PI3K-/AKT-/mTOR-Signalweg eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion des klarzelligen RCC einnimmt. Es wurde bereits vermutet, dass seine Komponenten und ihre Verknüpfungen weitaus komplexer sind als bisher bekannt. In dieser Arbeit wurden tatsächlich weitere deregulierter Kinasen identifiziert, die dem PI3K-/AKT-/mTOR-Signalweg zugeordnet werden können. Die genaue Rolle der veränderten Kinasen innerhalb dieses Signalweges sollten durch nachfolgende Untersuchungen analysiert werden.

Der mTOR-Signalweg führt im RCC zu einer gesteigerten Protein-Biosynthese und damit zu einem erhöhten Bedarf an ribosomalen Untereinheiten, wobei für die Reifung der 40S ribosomalen UE die daran beteiligte Kinase R1OK2 benötigt wird. R1OK2 gehört zu den wenigen regulierten Kinasen, die in dieser Studie identifiziert, aber noch nicht im Kontext mit Tumorgenese beschrieben wurden. Im nächsten Schritt wäre es interessant zu prüfen, ob R1OK2 korrekt an der Stelle des Translationsinitiationskomplexes (TIK) im mTOR-Signalweg integriert wurde. Zunächst sollte in Mutationsstudien mit dem phosphorylierten Thr-350 in Kombination mit Kinaseaktivitätsanalysen untersucht werden, ob und in welchem Maß die Phosphorylierung einen Einfluss auf die Aktivität von R1OK2 und die Reifung der 40S-ribosomalen UE hat. Anschließend könnte mit der Mutante oder anhand von Knockdown-Experimenten mit R1OK2 die Bildung des TIK und dessen Funktion untersucht und ggf. eine Beeinträchtigung ermittelt werden. Darüber hinaus ist bislang unklar, ob der mTOR-Signalweg die Expression von R1OK2 initiiert und damit seinen eigenen Bedarf an der ribosomalen 40S UE deckt. Die Inhibierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges mit LY294002 oder Wortmannin in Kombination mit Western Blot-Analysen mit einem R1OK2-spezifischen Antikörper könnte darüber wertvolle Einblicke liefern.

Eine weitere interessante, deregulierte Kinase ist LRRK2 und deren genaue Position und Funktion innerhalb AKT-/mTOR-Signalweg im klarzelligen Nierenzellkarzinom. Handelt es sich um eine vorgeschaltete Komponente, die über die Rezeptor-Tyrosinkinase MET den mTOR-Signalweg beeinflusst oder stellt LRRK2 eine direkt in der Signalkaskade involvierte Komponente darstellen. Beide Hypothesen könnten mit Phospho-spezifischen Antikörpern gegen MET (Y1234/1235), AKT (S473) und 4B-BP (T37/T46) im Western Blot untersucht werden. Zusätzlich könnte die Bestimmung direkter Interaktionspartner von LRRK2 z.B. Immunopräzipitation und anschließender Massenspektrometrie im ccRCC die Einordnung dieser Kinase in den mTOR-Signalweg erleichtern.

Die zusätzliche Analyse der Stadien-spezifischer Veränderungen führte zu der Hypothese, dass es im Laufe der Nierenzellkarzinom-Entwicklung zu einer Verlagerung der Aktivität des Ras-Raf-MAPK- zum PI3K/AKT/mTOR-Signalweges kommt. Zur Überprüfung könnten einerseits weitere umfassende quantitative Proteomanalysen durchgeführt werden, wobei mindestens drei Replikate jedes Stadiums abgedeckt werden sollten. Andererseits könnten identifizierte und regulierte Kinasen wie LIMK1, M4K4 und PAK4, die bereits im Zusammenhang mit dem MET/PI3K/AKT-Signalweg analysiert wurden, oder der MAPK-Signalweg, speziell ERK1/2, MP2K1 und MP2K2, mit Western Blot-Analysen an verschiedenen Tumorlysaten untersucht werden. Damit sollte gleichzeitig unterschieden



werden, ob es wirklich ein Stadien-spezifischer und damit entwicklungsrelevanter Aspekt ist oder ob es sich lediglich um ein Patienten-spezifisches Ereignis handelte. Zudem wäre eine funktionelle Charakterisierung dieser Kinasen im Zusammenhang mit Invasion und Metastasierung des Nierenzellkarzinoms interessant. Bestätigt sich in zukünftigen Analysen, dass diese Kinasen generell im ccRCC hochreguliert sind und bei metastasierten Tumoren mit höherem Differenzierungsgrad an Relevanz gewinnen, sollten diese Komponenten des PI3K/AKT/Motor Signalweg im Fokus neuer therapeutische Ansätze stehen.

Besonders im Hinblick auf die Wirkstoff-Forschung eröffnet diese Arbeit weitere Perspektiven. Neben regulierten Kinasen, als denkbaren therapeutischen Zielen, zeigen die proteomischen Studien die Möglichkeit auf, einen Großteil der vorhandenen Kinasen durch immobilisierte ATP-kompetitive Inhibitoren direkt aus dem Gewebe anzureichern. Damit ließe sich zukünftig auch die Selektivität klinisch-relevanter Inhibitoren direkt in dem zu behandelnden Gewebe prüfen und die Bindung weiterer Substrate nachweisen, was direkte Hinweise auf mögliche Nebenwirkungen liefern könnte. Aufbauend auf den ermittelten Substratprofilen könnte auch die Effizienz eines Inhibitors bestimmt werden. Möglicherweise lassen sich dadurch Kinasen identifizieren, die mit Wirkstoff-Resistenzen assoziiert sind. Sollte es zukünftig möglich sein, mit einer Art ELISA, basierend auf immobilisierten Inhibitoren sowie spezifischen Kinase-Antikörpern, patientenspezifische Wirksamkeitsprüfungen durchzuführen, würde die eine optimale Anpassung einer personalisierten Therapie ermöglichen.

Das Vorhandensein solch einer Resistenz kann mehrere Ursachen haben. So könnten differenzielle Phosphorylierungen die Sensitivität einer Proteinkinase gegenüber dem ATP-kompetitiven Inhibitor verändern, indem sie durch eine Konformationsänderung die Bindungsdomäne sterisch unzugänglich machen. Das in dieser Arbeit erlangte Wissen, über Phosphorylierungen an Kinasen im ccRCC, könnte hierzu beitragen. 30 Phosphorylierungen, die beim Vergleich von gesundem und Tumorgewebe als reguliert identifiziert wurden, sind funktionell noch nicht beschrieben. Untersuchungen dieser Phosphorylierungen sollten prüfen, ob sie die Bindungsfähigkeit und die Aktivität der Kinasen beeinflussen und damit Resistenzen auslösen. Wäre man zukünftig in der Lage, anhand der ermittelten regulierten Phosphorylierungen, Inhibitoren gegen die Proteinregion mit Phosphorylierung zu entwickeln, könnten mögliche sekundäre Bindungssubstrate und die einhergehenden Nebenwirkung minimieren werden. Ein interessanter Kandidat dafür wäre PCTK3, bei der neben einer erhöhten Häufigkeit auch

differentielle Phosphorylierungen außerhalb der Kinasedomäne dokumentiert wurden. Ein ATP-kompetitiver Inhibitor, der sich gegen die in den PCTAIRE-Familien konservierte ATP-Region richtet, würde hier mit hoher Wahrscheinlichkeit auch PCTK1 und PCTK2 binden und unter Umständen Nebenwirkungen erzeugen.

Die Resistenz gegenüber einem Wirkstoff könnte ebenfalls durch Mutationen oder strukturelle Modifikationen ausgelöst werden. So wurde für CSK22 eine Veränderung des C-Terminus detektiert. Zum einen wäre interessant herauszufinden, was die Ursache für verkürzte Version von CSK22 im Tumor darstellt, ob es sich um eine Deletion, translationale oder posttranslationale Abspaltung handelt. Zum anderen könnte der Einfluss solch einer Veränderung auf das Bindungsverhalten gegenüber dem Inhibitor durch eine Kooperation mit dem Bereich der Strukturbiologie weiter untersucht werden. Denn eine dreidimensionale Kristallstruktur kann ein genaues Bild der veränderten Struktur wiedergeben und Hinweise auf Bindungsverhalten und Aktivität liefern.

Durch diese Arbeit wurde die Anwendbarkeit eines proteomischen Arbeitsablaufes zur Anreicherung und Charakterisierung von Kinasen und Phosphorylierungen aus humanem Nierenzellkarzinom und gesundem Gewebe demonstriert. In Kombination mit der quantitativen Analyse wurden RCC-spezifische Regulationen detektiert, die zudem verschiedene Stadien abdecken. Die Einordnung regulierter Kinasen in Signalwege und physiologische Prozesse im Nierenzellkarzinom schafft die Basis weiterer Untersuchungen und trägt dazu bei, das Verständnis von Tumorentwicklung und Ausbreitung zu verbessern. Die in dieser Studie entwickelte experimentelle Strategie kann aber sicher nicht nur auf Untersuchungen des Nierenzellkarzinoms angewendet werden. Die Technologie lässt sich auch auf andere Krebserkrankungen übertragen. Dabei ist nicht nur der Vergleich von gesundem und erkranktem Gewebe interessant. Bei Tumoren, wo keine vergleichende gesunde Gewebeprobe hinzugezogen werden können, bietet die Analyse verschiedener Tumortypen die Möglichkeit, Unterschiede in der Aktivität von Signalwegen zu dokumentieren. So könnte eine gezieltere Therapie gewählt werden, um die Heilungschancen von Patienten zu verbessern.

Signalkomponenten wie Proteinkinasen mittels chemischer Proteomik ausgehend von Gewebematerial und Biopsien anzureichern, wird auch in Zukunft eine wichtige Rolle bei der Analyse von veränderten Signalwegen im Krebsgewebe spielen und neue Impulse für translationale Forschung liefern.

## 7. ANHANG

### 7.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bezeichnung
2D-GE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
aPK	Atypische Proteinkinase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
CCD	Charge-coupled device
ccRCC	Clear cell renal cell carcinoma (klarzelliges Nierenzellkarzinom)
chrRCC	Chromophobe renal cell carcinoma (chromophobes Nierenzellkarzinom)
CID	Collision induced dissociation
CML	Chronische Myeloide Leukämie
C-Terminal	Carboxygruppen-terminal
Da	Dalton
Dd	Doppelt destilliert
DNA	Desoxyribonuclein Acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Elektrospray Ionisation
G	Gramm
Ga	Gallium
HGF	Hepatocyte Growth Factor (Hepatozyten-Wachstumsfaktor)
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie)
ICAT	Isotope-coded affinity tag
IMAC	Immobilized metal affinity chromatography (Metallionen-Affinitäts-Chromatographie)
IoR	Interval of robustness
iTRAQ	Isobaric tag for relative and absolute quantitation
KRF	Regulationsfaktor der Kinase
L	Liter
LC	Liquid-Chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
LTQ	Linear trap quadrupole

Abkürzung	Bezeichnung
M	Molar
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionisation
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute
mg	Milli-Gramm
ml	Milli-Liter
mM	Milli-Molar
MS	Massenspektrometrie
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
µl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PK	Proteinkinase
pRF	Regulationsfaktor der Phosphorylierung
pSer	Phosphoryliertes Serin
pThr	Phosphoryliertes Threonin
pTyr	Phosphoryliertes Tyrosin
PTM	Posttraslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RCC	Renal cell carcinoma (Nierenzellkarzinom)
RF	Regulationsfaktor
RNA	Ribonuclein acid
RP	Reserved phase chromatography (Umkehrphasen-Chromatographie)
SCX	Strong cation exchange (Kationenaustausch-Chromatographie)
Sek.	Sekunde
SILAC	Stable isotope labeling by amino acids in cell culture
Tab.	Tabelle
TOF	Time-of-flight (Flugzeit-Massenanalysator)
TTD	Therapeutic Target Database
UE	Untereinheiten
V	Volt
v/v	Volume per volume (Volumen pro Volumen)
w/v	Weight per volume (Massen pro Volumen)
WHO	World Health Organization
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

## 7.2 TABELLEN

Tab. 7-1: Daten zur Identifizierung und Zuordnung der Kinasen

Uniprot	Proteinname	Kinase	Klassifizierung	Analyse 1:		Analyse 2:		Analyse 3:	
Accession		Gruppe		002 & 003		004 & 007		008 & 011	
				øScore <sup>+</sup>	Peptid <sup>#</sup>	øScore <sup>+</sup>	Peptid <sup>#</sup>	øScore <sup>+</sup>	Peptid <sup>#</sup>
Q2M2I8	AAK1_HUMAN	PK	Ser/Thr	13863	12	11097	22	7554	16
Q9Y478	AAKB1_HUMAN	UE		682	2	4938	8	1341	7
O43741	AAKB2_HUMAN	UE		1987	5	4173	10	3146	8
P54619	AAKG1_HUMAN	UE		9710	5	8039	13	3444	8
Q9UGJ0	AAKG2_HUMAN	UE		3333	5	2392	13	1332	9
Q13131	AAPK1_HUMAN	PK	Ser/Thr	8041	10	9786	18	5217	14
P54646	AAPK2_HUMAN	PK	Ser/Thr	4246	7	7716	15	2509	6
P00519	ABL1_HUMAN	PK	Tyr			168	4	198	3
P42684	ABL2_HUMAN	PK	Tyr	1138	6	1312	9	2225	14
Q07912	ACK1_HUMAN	PK	Tyr			195	5	67	2
P36896	ACV1B_HUMAN	PK	Ser/Thr			192	2	108	1
Q04771	ACVR1_HUMAN	PK	Ser/Thr	69	1	779	7	533	3
Q13315	ATM_HUMAN	AK	Ser/Thr			277	4	221	5
Q96GD4	AURKB_HUMAN	PK	Ser/Thr					158	1
Q9NSY1	BMP2K_HUMAN	PK	Ser/Thr	1725	4	2203	16	2605	11
Q13873	BMPR2_HUMAN	PK	Ser/Thr	354	6	628	6	781	6
O00238	BMR1B_HUMAN	PK	Ser/Thr	113	2				
Q06187	BTK_HUMAN	PK	Tyr			246	2	117	2
Q9BWU1	CD2L6_HUMAN	PK	Ser/Thr			220	3	163	2
P06493	CDK1_HUMAN	PK	Ser/Thr	315	4	453	3	544	4
Q15131	CDK10_HUMAN	PK	Ser/Thr	326	4	390	8	563	6
P24941	CDK2_HUMAN	PK	Ser/Thr	1625	4	1891	8	732	4
P11802	CDK4_HUMAN	PK	Ser/Thr	1372	6	3572	12	690	6
Q00535	CDK5_HUMAN	PK	Ser/Thr	3548	6	8065	11	1730	6
Q00534	CDK6_HUMAN	PK	Ser/Thr	5013	8	5512	15	2956	9
P50613	CDK7_HUMAN	PK	Ser/Thr	2479	7	2133	9	1482	8
P50750	CDK9_HUMAN	PK	Ser/Thr	3994	7	4212	13	1947	9
Q00532	CDKL1_HUMAN	PK	Ser/Thr					163	2
Q92772	CDKL2_HUMAN	PK	Ser/Thr					147	1
O76039	CDKL5_HUMAN	PK	Ser/Thr	1475	7	2182	18	1945	13
P35790	CHKA_HUMAN	Non-PK		373	3	170	1		
Q9Y259	CHKB_HUMAN	Non-PK		766	6	728	5	217	3
P49759	CLK1_HUMAN	PK	Tyr/Ser/Thr	159	1	748	7	429	3
P49760	CLK2_HUMAN	PK	Tyr/Ser/Thr	231	2	590	5	437	3
Q9HAZ1	CLK4_HUMAN	PK	Tyr/Ser/Thr			110	2	35	1
P07333	CSF1R_HUMAN	PK	Tyr	249	1	483	3	453	5
P41240	CSK_HUMAN	PK	Tyr	889	7	2980	12	1059	7
P68400	CSK21_HUMAN	PK	Ser/Thr	2437	3	23018	15	2673	13
P19784	CSK22_HUMAN	PK	Ser/Thr	2512	4	17493	15	2873	12
P67870	CSK2B_HUMAN	UE		6860	5	10895	8	2138	8
P53355	DAPK1_HUMAN	PK	Ser/Thr	273	1	214	2	405	1
O43293	DAPK3_HUMAN	PK	Ser/Thr			140	1	134	2
Q08345	DDR1_HUMAN	PK	Tyr	412	4	1712	10	788	5
Q16832	DDR2_HUMAN	PK	Tyr			174	2	177	2
Q3LXA3	DHAK_HUMAN	Non-PK						697	5
Q09013	DMPK_HUMAN	PK	Ser/Thr	306	2	469	4	939	7
Q13627	DYR1A_HUMAN	PK	Tyr/Ser/Thr	86	1	549	7	151	4
P21709	EPHA1_HUMAN	PK	Tyr	77	1	139	2	441	5
P29317	EPHA2_HUMAN	PK	Tyr	3765	18	5378	27	2913	15
P54764	EPHA4_HUMAN	PK	Tyr	153	1	638	5	1252	8
Q15375	EPHA7_HUMAN	PK	Tyr	949	3	2775	17	2254	15
P54762	EPHB1_HUMAN	PK	Tyr					898	6
P29323	EPHB2_HUMAN	PK	Tyr	841	10	2543	18	2363	13
P54753	EPHB3_HUMAN	PK	Tyr					122	1
P54760	EPHB4_HUMAN	PK	Tyr	1768	12	1953	13	2680	15
O75460	ERN1_HUMAN	PK	Ser/Thr			87	2	302	4
Q05397	FAK1_HUMAN	PK	Tyr	12363	26	10725	38	5350	22
Q14289	FAK2_HUMAN	PK	Tyr	4180	21	4357	31	2218	20
P16591	FER_HUMAN	PK	Tyr	1878	13	2617	23	1797	11
P07332	FES_HUMAN	PK	Tyr	1660	11	4170	23	3313	16
P21802	FGFR2_HUMAN	PK	Tyr			87	2	111	2
P09769	FGR_HUMAN	PK	Tyr	711	6	1284	12	448	5
Q9H479	FN3K_HUMAN	Non-PK				184	2	31	1

# Anhang

P42345	FRAP_HUMAN	AK	Ser/Thr					323	6
P42685	FRK_HUMAN	PK	Tyr	1221	6	1389	10	1213	10
Q8N0W3	FUK_HUMAN	Non-PK						207	1
P06241	FYN_HUMAN	PK	Tyr	1135	7	1946	10	670	5
Q14976	GAK_HUMAN	PK	Ser/Thr	8311	20	8700	33	4429	23
P51570	GALK1_HUMAN	Non-PK		145	2			343	5
Q8IVS8	GLCTK_HUMAN	Non-PK						88	1
P43250	GRK6_HUMAN	PK	Ser/Thr					78	1
P49840	GSK3A_HUMAN	PK	Ser/Thr	4669	3	4280	9	3129	7
P49841	GSK3B_HUMAN	PK	Ser/Thr	6237	6	3805	10	4168	8
P08631	HCK_HUMAN	PK	Tyr	925	3	2814	11	1267	6
Q9UPZ9	ICK_HUMAN	PK	Ser/Thr					72	1
P08069	IGF1R_HUMAN	PK	Tyr	1671	13	1654	16	869	12
Q14164	IKKE_HUMAN	PK		67	2	273	4	521	7
Q13418	ILK_HUMAN	PK	Ser/Thr	1992	9	6466	15	2117	10
P06213	INSR_HUMAN	PK	Tyr	5728	17	8562	34	3555	13
Q9Y616	IRAK3_HUMAN	PK	Ser/Thr	166	1	101	2	95	2
Q9NWZ3	IRAK4_HUMAN	PK	Ser/Thr	67	1	687	6	170	2
P23458	JAK1_HUMAN	PK	Tyr	1024	9	1695	16	795	7
P52333	JAK3_HUMAN	PK	Tyr	280	1	164	1	328	3
P27144	KAD4_HUMAN	Non-PK				83	1	84	2
P13861	KAP2_HUMAN	UE						355	5
P17612	KAPCA_HUMAN	PK	Ser/Thr			288	2	79	1
P48729	KC1A_HUMAN	PK	Ser/Thr	3457	5	6423	8	2524	6
P48730	KC1D_HUMAN	PK	Ser/Thr	4279	5	2879	6	2223	5
P49674	KC1E_HUMAN	PK	Ser/Thr	3407	6	1519	6	1999	5
Q9HCP0	KC1G1_HUMAN	PK	Ser/Thr	305	1	1254	3	68	2
P78368	KC1G2_HUMAN	PK	Ser/Thr			208	1	551	1
Q9Y6M4	KC1G3_HUMAN	PK	Ser/Thr	761	2	978	3	1404	2
Q13554	KCC2B_HUMAN	PK	Ser/Thr	1026	4	717	6	208	4
Q13557	KCC2D_HUMAN	PK	Ser/Thr	16259	7	13234	12	9798	12
Q13555	KCC2G_HUMAN	PK	Ser/Thr	4800	6	7186	10	3239	8
Q13976	KGP1A_HUMAN	PK	Ser/Thr	659	2	1087	4	703	2
P50053	KHK_HUMAN	Non-PK		5925	10	7191	12	1384	10
P10721	KIT_HUMAN	PK	Tyr	3367	20	715	8	1213	11
Q96RR4	KKCC2_HUMAN	PK	Ser/Thr					537	4
P46019	KPB2_HUMAN	UE		1103	8	1266	11	1655	11
Q93100	KPBB_HUMAN	UE		1096	11	757	10	1236	13
P17252	KPCA_HUMAN	PK	Ser/Thr	211	3	375	6	328	4
Q05655	KPCD_HUMAN	PK	Ser/Thr			121	2	584	5
Q15139	KPCD1_HUMAN	PK	Ser/Thr	2024	6	4119	11	2539	11
Q9BZL6	KPCD2_HUMAN	PK	Ser/Thr	2216	7	3514	15	2244	10
Q94806	KPCD3_HUMAN	PK	Ser/Thr	306	3	364	2	644	5
Q04759	KPCT_HUMAN	PK	Ser/Thr			198	3	367	4
P11801	KPSH1_HUMAN	PK	Ser/Thr			66	1		
P14618	KPYM_HUMAN	Non-PK		270	4	864	11	1635	14
Q15418	KS6A1_HUMAN	PK	Ser/Thr	3115	8	16808	25	4914	18
Q15349	KS6A2_HUMAN	PK	Ser/Thr	48	1	136	2	387	5
P51812	KS6A3_HUMAN	PK	Ser/Thr	5182	11	10985	24	4948	16
Q75676	KS6A4_HUMAN	PK	Ser/Thr					286	2
P43405	KSYK_HUMAN	PK	Tyr	1021	9	1352	11	1207	12
Q9HA64	KT3K_HUMAN	Non-PK		4160	9	8834	15	4109	10
Q95835	LATS1_HUMAN	PK	Tyr			126	1		
P06239	LCK_HUMAN	PK	Tyr			777	4	584	3
P53667	LIMK1_HUMAN	PK	Ser/Thr	777	10	1541	16	1504	7
P53671	LIMK2_HUMAN	PK	Ser/Thr	40	0	259	4		
Q5S007	LRRK2_HUMAN	PK	Ser/Thr	265	3	1420	15	435	5
P07948	LYN_HUMAN	PK	Tyr	3526	10	9202	14	2800	10
Q13233	M3K1_HUMAN	PK	Ser/Thr			309	3	573	6
Q16584	M3K11_HUMAN	PK	Ser/Thr	1524	10	2863	17	2669	12
Q9Y2U5	M3K2_HUMAN	PK	Ser/Thr	1341	6	1383	9	954	8
Q99759	M3K3_HUMAN	PK	Ser/Thr	1113	6	998	5	1208	8
Q99683	M3K5_HUMAN	PK	Ser/Thr	1808	15	2322	23	1738	17
Q95382	M3K6_HUMAN	PK	Ser/Thr	209	5	288	4	418	7
Q5TCX8	M3KL4_HUMAN	PK	Ser/Thr					86	1
Q92918	M4K1_HUMAN	PK	Ser/Thr	89	2	148	2	399	4
Q12851	M4K2_HUMAN	PK	Ser/Thr			409	4	335	3
Q8IVH8	M4K3_HUMAN	PK	Ser/Thr	1842	8	4270	14	1314	7
Q95819	M4K4_HUMAN	PK	Ser/Thr	443	6	1373	7	1457	8

# Anhang

Q9Y4K4	M4K5_HUMAN	PK	Ser/Thr	175	2	972	10	636	7
Q8IW41	MAPK5_HUMAN	PK	Ser/Thr			1903	1		
Q9P0L2	MARK1_HUMAN	PK	Ser/Thr	102	1	501	6	1169	11
Q7KZ17	MARK2_HUMAN	PK	Ser/Thr	5821	13	5599	26	5257	20
P27448	MARK3_HUMAN	PK	Ser/Thr	2627	10	2824	18	3949	14
Q12866	MERTK_HUMAN	PK	Tyr	759	8	1076	9	935	10
P08581	MET_HUMAN	PK	Tyr	1019	6	872	10	3239	17
P28482	MK01_HUMAN	PK	Ser/Thr	37101	8	35559	14	12052	13
P27361	MK03_HUMAN	PK	Ser/Thr	8274	11	16986	17	6761	11
Q13164	MK07_HUMAN	PK	Ser/Thr	75	1	342	4	411	5
P45983	MK08_HUMAN	PK	Ser/Thr	569	2	2393	6	656	3
P45984	MK09_HUMAN	PK	Ser/Thr	1677	4	3350	8	1491	5
P53779	MK10_HUMAN	PK	Ser/Thr	347	3	885	4	448	3
O15264	MK13_HUMAN	PK	Ser/Thr	506	5	1952	11	1200	7
Q16539	MK14_HUMAN	PK	Ser/Thr			96	1		
Q8TD08	MK15_HUMAN	PK	Ser/Thr	847	1	1726	2	131	2
Q9NYL2	MLTK_HUMAN	PK	Ser/Thr	747	4	1840	8	680	6
Q02750	MP2K1_HUMAN	PK	Tyr/Ser/Thr	623	2	1911	5	507	4
P36507	MP2K2_HUMAN	PK	Tyr/Ser/Thr	272	3	1486	7	75	2
P46734	MP2K3_HUMAN	PK	Tyr/Ser/Thr			298	3	191	3
P52564	MP2K6_HUMAN	PK	Tyr/Ser/Thr	2443	6	1973	9	1795	6
O14733	MP2K7_HUMAN	PK	Tyr/Ser/Thr			62	1	67	2
Q9Y5S2	MRCKB_HUMAN	PK	Ser/Thr	4048	24	8046	44	2868	27
Q86YV6	MYLK4_HUMAN	PK	Ser/Thr					69	1
Q15746	MYLK_HUMAN	PK	Ser/Thr	254	2	816	2	152	3
Q9UJ70	NAGK_HUMAN	Non-PK		110	1	315	3	667	5
Q96PY6	NEK1_HUMAN	PK	Tyr/Ser/Thr			157	3	730	7
Q6P3R8	NEK5_HUMAN	PK	Ser/Thr			150	1		
Q8TD19	NEK9_HUMAN	PK	Ser/Thr	18307	20	12732	35	7936	23
Q9UBE8	NLK_HUMAN	PK	Ser/Thr	105	2			193	3
O60285	NUAK1_HUMAN	PK	Ser/Thr					209	1
Q9H093	NUAK2_HUMAN	PK	Ser/Thr			313	3		
O95747	OXSRI_HUMAN	PK	Ser/Thr					190	2
O00443	P3C2A_HUMAN	Non-PK				209	3	775	8
Q96013	PAK4_HUMAN	PK	Ser/Thr	10141	12	9593	16	6933	19
Q9NVE7	PANK4_HUMAN	Non-PK						138	1
Q00536	PCTK1_HUMAN	PK	Ser/Thr	3057	10	5173	17	4243	13
Q00537	PCTK2_HUMAN	PK	Ser/Thr	1318	10	3954	16	1956	8
Q07002	PCTK3_HUMAN	PK	Ser/Thr	5769	11	11009	21	5024	17
Q15118	PDK1_HUMAN	AK						75	1
Q15119	PDK2_HUMAN	AK		130	2	110	2	156	1
Q15120	PDK3_HUMAN	AK		170	3	170	2	457	6
O15530	PDPK1_HUMAN	PK	Ser/Thr	69	1	277	3		
O00764	PDXK_HUMAN	Non-PK		28541	11	31461	18	8890	16
O94921	PFTK1_HUMAN	PK	Ser/Thr	871	7	1568	10	897	8
P00558	PGK1_HUMAN	Non-PK						293	5
P09619	PGFRB_HUMAN	PK	Tyr	82	2			198	3
P15735	PHKG2_HUMAN	PK	Ser/Thr	854	7	1072	9	718	6
P42356	PI4KA_HUMAN	Non-PK		317	4			299	5
O00329	PK3CD_HUMAN	Non-PK		821	8	2803	19	1414	11
Q16513	PKN2_HUMAN	PK	Ser/Thr	270	2			151	2
P78527	PRKDC_HUMAN	AK	Ser/Thr	417	5	273	4	1263	15
Q96S44	PRPK_HUMAN	PK	Ser/Thr	10137	8	5694	9	4862	8
Q9BVS4	RIOK2_HUMAN	AK	Ser/Thr	227	1	1510	11	1056	7
O43353	RIPK2_HUMAN	PK	Ser/Thr	1738	9	2822	13	2326	11
Q13464	ROCK1_HUMAN	PK	Ser/Thr	415	7	2033	19	3495	31
O75116	ROCK2_HUMAN	PK	Ser/Thr	1347	11	1038	12	1990	19
O00141	SGK1_HUMAN	PK	Ser/Thr					65	1
Q9H2G2	SLK_HUMAN	PK	Ser/Thr	896	6	1347	14	2190	17
Q9H0K1	SNIL2_HUMAN	PK	Ser/Thr	592	6	1352	13	1847	9
P12931	SRC_HUMAN	PK	Tyr	5303	7	5447	13	3652	11
O94804	STK10_HUMAN	PK	Ser/Thr			623	5	456	5
Q15831	STK11_HUMAN	PK	Ser/Thr	455	2	466	3	428	3
O75716	STK16_HUMAN	PK	Ser/Thr	101	2	1784	9	654	4
Q9Y6E0	STK24_HUMAN	PK	Ser/Thr	142	1			104	2
Q13188	STK3_HUMAN	PK	Ser/Thr	2453	9	4656	12	2374	8
Q9BYT3	STK33_HUMAN	PK	Ser/Thr	65	1	266	3	120	1
Q13043	STK4_HUMAN	PK	Ser/Thr	1924	8	3156	13	2430	10
O14965	STK6_HUMAN	PK	Ser/Thr					99	1

## Anhang

Q7L7X3	TAOK1_HUMAN	PK	Ser/Thr	2103	11	3643	20	2534	16
Q9UL54	TAOK2_HUMAN	PK	Ser/Thr	663	7	1651	11	614	6
Q9H2K8	TAOK3_HUMAN	PK	Ser/Thr	308	4	1078	8	812	6
Q9UHD2	TBK1_HUMAN	PK	Ser/Thr	6926	14	8986	29	5272	20
P42680	TEC_HUMAN	PK	Tyr	649	7	1027	10	1482	13
P36897	TGFR1_HUMAN	PK	Ser/Thr					244	3
P37173	TGFR2_HUMAN	PK	Ser/Thr	757	8	1689	10	806	9
Q02763	TIE2_HUMAN	PK	Tyr	532	4	916	9	702	6
Q9UKI8	TLK1_HUMAN	PK	Ser/Thr			65	1	169	3
Q86UE8	TLK2_HUMAN	PK	Ser/Thr			85	2	256	4
Q9UKE5	TNIK_HUMAN	PK	Ser/Thr	1228	6	1712	9	1422	10
Q13470	TNK1_HUMAN	PK	Tyr					235	4
Q96KB5	TOPK_HUMAN	PK	Ser/Thr			181	1	43	1
Q6SA08	TSSK4_HUMAN	PK	Ser/Thr			109	1		
P42681	TXK_HUMAN	PK	Tyr	128	1	64	1	32	1
Q6PHR2	ULK3_HUMAN	PK	Ser/Thr	382	2	805	5	185	2
P35916	VGFR3_HUMAN	PK	Tyr	979	7	1073	9	1266	10
Q86Y07	VRK2_HUMAN	PK	Ser/Thr			387	5	142	2
P30291	WEE1_HUMAN	PK	Tyr					104	1
P07947	YES_HUMAN	PK	Tyr	1585	6	2174	8	722	5

<sup>†</sup> mittlerer Proteinscore

<sup>#</sup> Anzahl einzigartiger Peptide

Kinasegruppen: PK = Proteinkinasen, AK = atypische Proteinkinasen, Non-PK = Nicht-Proteinkinasen  
UE = Untereinheiten

Klassifizierung: Ser/Thr = Serine-/Threonine-Proteinkinase; Tyr = Tyrosin-Proteinkinase  
Ser/Thr/Tyr = Serine-/Threonine-/Tyrosin-Proteinkinase



Tab. 7-2: Daten der quantitativen Analyse mit [log2]RF

Unprot.	Proteinname	RF N002T002	IoR	RF N003T003	IoR	RF N002N003	IoR	RF N004T004	IoR	RF N007T007	IoR	RF N004N007	IoR	RF N008T008	IoR	RF N011T011	IoR	RF N011N008	IoR
Q2M218	AAK1 HUMAN	-0.64	0.06	-0.08	0.05	-0.20	0.05	0.24	0.05	-0.01	0.05	-0.10	0.05	-0.37	0.08	-0.69	0.09	0.07	0.06
Q9Y478	AAKB1 HUMAN	0.38	0.18	0.87	0.26	0.15	0.18	0.60	0.09	0.32	0.08	-0.12	0.07	0.11	0.15	-0.08	0.17	0.23	0.15
Q43741	AAKB2 HUMAN	1.31	0.23	2.14	0.48	0.24	0.12	0.80	0.12	0.56	0.1	0.08	0.09	0.49	0.13	1.00	0.17	-0.06	0.1
P54619	AAKG1 HUMAN	0.76	0.07	0.96	0.08	0.31	0.05	0.30	0.05	0.34	0.06	-0.08	0.05	0.66	-0.1	0.64	0.09	-0.10	0.07
Q9UGJ0	AAKG2 HUMAN	0.15	0.09	3.87	1.2	0.61	0.11	-0.31	0.11	0.24	0.1	0.16	0.1	-0.28	0.13	0.16	0.13	-0.07	0.12
Q13131	AAPK1 HUMAN	0.68	0.07	2.07	0.16	0.26	0.05	0.56	0.06	0.41	0.06	0.03	0.05	0.75	0.08	0.42	0.07	0.03	0.06
P54646	AAPK2 HUMAN	0.70	0.1	0.44	0.08	0.21	0.07	0.38	0.06	0.10	0.06	-0.14	0.06	-0.29	0.09	0.87	0.14	-0.07	0.09
P00519	ABL1 HUMAN							-0.03	0.38	0.14	0.29	-0.15	0.33	-0.64	0.32	0.07	0.25	0.21	0.24
P42684	ABL2 HUMAN	0.00	0.13	-0.25	0.14	-0.20	0.14	0.77	0.19	0.26	0.15	-0.12	0.14	0.88	0.16	1.00	0.19	0.03	0.11
Q07912	ACK1 HUMAN							0.57	0.4	0.75	0.45	-0.31	0.29	-0.55	0.48	0.77	0.54	0.41	0.42
P36896	ACV1B HUMAN							0.21	0.27	-0.04	0.23	-0.11	0.27	-0.72	0.52	0.16	0.37	0.25	0.39
Q04771	ACVR1 HUMAN	-0.40	0.42	-1.47	27.6	-0.16	0.37	0.01	0.13	-0.40	0.15	-0.16	0.13	0.54	0.2	0.29	0.18	-0.12	0.15
Q13315	ATM HUMAN							1.15	0.49	0.51	0.32	-0.18	0.27	0.77	0.32	0.61	0.3	-0.32	0.23
Q96GD4	AURKB HUMAN													2.87	1.8	-0.91	0.49	-0.23	0.31
Q9NSY1	BMP2K HUMAN	0.34	0.12	0.61	0.16	-0.28	0.13	0.38	0.1	0.86	0.14	-0.25	0.09	-0.06	0.11	0.62	0.13	0.07	0.1
Q13873	BMPK2 HUMAN	0.18	0.21	-0.45	0.25	-0.08	0.21	-0.20	0.14	-0.06	0.13	-0.24	0.14	-0.10	0.15	-0.16	0.13	-0.03	0.14
Q00238	BMRI1B HUMAN	-0.89	0.6	2.16	1.13	0.06	0.29												
Q06187	BTIK HUMAN							1.77	0.61	1.30	0.47	-0.28	0.22	0.46	0.36	1.23	0.62	0.34	0.34
Q9BWU1	CD2L6 HUMAN							0.39	0.27	0.26	0.25	0.04	0.23	1.06	0.54	0.70	0.42	0.30	0.32
P06493	CDK1 HUMAN	1.52	0.52	0.12	0.2	0.06	0.2	1.61	0.49	2.32	0.8	0.04	0.18	3.44	1.6	0.79	0.24	-0.14	0.16
Q15131	CDK10 HUMAN	-0.36	0.21	0.26	0.22	-0.11	0.19	-0.19	0.16	-0.19	0.15	0.10	0.15	-0.11	0.16	-0.44	0.2	0.08	0.16
P24941	CDK2 HUMAN	1.04	0.19	1.21	0.21	-0.08	0.1	0.95	0.16	0.78	0.14	0.24	0.1	1.48	0.32	1.01	0.23	-0.20	0.13
P11802	CDK4 HUMAN	0.93	0.16	-1.09	0.18	-0.49	0.12	1.42	0.16	0.54	0.09	0.11	0.07	-0.42	0.16	1.24	0.28	-0.11	0.13
Q00535	CDK5 HUMAN	-0.04	0.08	-0.37	0.1	-0.37	0.09	0.23	0.05	0.24	0.05	0.07	0.05	0.04	0.1	-0.12	0.09	-0.14	0.09
Q00534	CDK6 HUMAN	1.29	0.13	-1.23	0.13	-0.30	0.07	0.43	0.07	0.41	0.07	-0.16	0.06	0.58	0.09	1.44	0.17	0.06	0.07
P50613	CDK7 HUMAN	-0.10	0.09	-0.20	0.09	-0.49	0.11	0.24	0.1	0.28	0.11	-0.06	0.1	0.85	0.16	-0.10	0.11	-0.04	0.11
P50750	CDK9 HUMAN	0.44	0.08	1.01	0.12	-0.08	0.07	0.49	0.09	0.30	0.08	0.23	0.07	-0.88	0.4	-0.15	0.3	0.03	0.24
Q00532	CDKL1 HUMAN													-1.25	0.62	0.32	0.34	0.34	0.34
Q92772	CDKL2 HUMAN													0.08	0.09	-0.36	0.11	0.07	0.09
P76039	CDKL5 HUMAN	-0.31	0.11	-0.59	0.14	0.01	0.12	0.48	0.11	-0.19	0.08	0.42	0.1						
P35790	CHKA HUMAN	0.19	0.17	3.43	1.75	-0.19	0.18	0.01	0.27	0.11	0.25	0.10	0.25						
Q9Y259	CHKB HUMAN	0.28	0.18	3.01	1.17	-0.06	0.15	-0.12	0.2	-0.03	0.18	-0.12	0.17	0.62	0.33	0.04	0.22	0.12	0.23
P49759	CLK1 HUMAN	0.45	0.36	-0.48	0.36	0.18	0.3	0.08	0.14	-0.07	0.13	0.21	0.14	0.23	0.17	0.34	0.19	-0.06	0.17
P49760	CLK2 HUMAN	0.28	0.24	-0.01	0.24	-0.12	0.22	0.24	0.18	-0.01	0.18	-0.03	0.17	-0.04	0.19	0.11	0.18	0.08	0.19
Q9HAZ1	CLK4 HUMAN							0.10	0.43	0.44	0.43	-0.04	0.31		0.61		0.72		0.48
P07333	CSF1R HUMAN	2.27	1.06	0.65	0.3	-0.07	0.22	1.01	0.36	1.27	0.42	-0.66	0.26	-0.76	0.29	0.99	0.35	0.93	0.32
P41240	CSK HUMAN	1.33	0.29	0.34	0.15	0.45	0.16	0.39	0.09	0.15	0.08	-0.41	0.09	0.30	0.12	0.38	0.14	0.16	0.12
P68400	CSK21 HUMAN	0.52	0.1	-0.04	0.08	-0.25	0.08	0.43	Exact	0.41	Exact	-0.03	Exact	-0.14	0.08	0.16	0.08	0.10	0.07
P19784	CSK22 HUMAN	0.45	0.1	0.41	0.1	-0.15	0.1	0.41	Exact	0.25	Exact	-0.08	Exact	0.30	0.09	0.32	0.08	-0.01	0.08
P67870	CSK2B HUMAN	0.44	0.06	0.30	0.06	-0.26	0.05	0.37	0.05	0.32	Exact	0.01	Exact	-0.31	0.09	0.66	0.11	0.19	0.08
P53355	DAPK1 HUMAN	2.14	0.76	-0.92	0.3	0.30	0.2	-0.07	0.27	0.00	0.27	-0.03	0.23	0.93	0.27	2.11	0.61	-0.24	0.17
Q43293	DAPK3 HUMAN							-0.63	0.4	-0.44	0.35	0.01	0.29	-0.72	0.43	0.04	0.29	0.55	0.38
Q08345	DDR1 HUMAN	-0.07	0.17	1.14	0.35	0.14	0.19	0.12	0.1	-0.39	0.11	0.00	0.1	0.33	0.15	0.26	0.13	0.19	0.13
Q16832	DDR2 HUMAN							-0.90	0.45	-0.51	0.32	-0.04	0.28	-1.87	0.78	-1.04	0.47	0.20	0.26
Q3LXA3	DHAK HUMAN													-1.20	0.29	-1.03	0.29	-0.08	0.15
Q09013	DMPK HUMAN	0.08	0.2	0.82	0.29	0.03	0.19	-1.67	0.51	-0.76	0.26	-0.14	0.18	-1.50	0.33	-1.38	0.3	0.64	0.17
Q13627	DYR1A HUMAN	-0.07	0.34	0.52	0.45	0.28	0.39	-0.21	0.17	-0.06	0.16	-0.25	0.18	0.66	0.42	-0.10	0.31	0.04	0.27
P21709	EPHA1 HUMAN	noT	0	noT	0	0.08	0.49	-0.52	0.38	-0.81	0.42	-0.01	0.26	-0.41	0.3	-1.26	0.4	-0.15	0.16
P29317	EPHA2 HUMAN	0.44	0.09	-0.31	0.08	0.48	0.09	0.28	0.07	-0.50	0.08	0.24	0.06	0.15	0.09	-0.04	0.09	0.01	0.08
P54764	EPHA4 HUMAN	0.00	0.27	-1.80	0.88	0.69	0.41	-0.31	0.18	-0.72	0.24	0.04	0.17	-0.23	0.16	1.03	0.22	-0.04	0.12
Q15375	EPHA7 HUMAN	-0.97	0.27	-2.06	0.81	-0.15	0.15	1.03	0.14	0.77	0.12	-0.37	0.1	1.33	0.19	1.33	0.09	-0.25	0.09
P54762	EPH1B HUMAN													1.55	0.42	0.03	0.16	0.00	0.17
P29323	EPH2B HUMAN	-0.71	0.22	-2.29	0.68	1.20	0.3	-0.59	0.11	-1.95	0.28	1.06	0.15	-1.22	0.18	-1.71	0.26	0.26	0.1

P54753	EPHB3 HUMAN	-0.53	0.12	-0.70	0.14	0.38	0.11	-0.03	0.09	-1.01	0.16	0.14	0.09	-1.76	1.08	0.00	0.34	0.10	0.35
P54760	EPHB4 HUMAN																		
O75460	ERN1 HUMAN	-0.03	Exact	1.08	Exact	-0.07	Exact	0.37	0.41	1.32	0.8	-0.31	0.4	0.69	0.28	0.33	0.06	-0.28	0.21
O05397	FAK1 HUMAN												Exact	-0.11	0.06	0.33	0.06	0.07	0.06
O14289	FAK2 HUMAN	0.46	0.08	1.91	0.2	-0.29	0.07	-0.33	0.07	0.08	0.06	-0.32	0.07	0.46	0.1	0.08	0.08	0.08	0.08
P16591	FER HUMAN	0.31	0.09	0.82	0.13	0.03	0.09	0.14	0.08	-0.10	0.07	0.06	0.08	0.23	0.09	0.18	0.09	0.01	0.09
P07332	FES HUMAN	1.42	0.23	-0.59	0.13	0.07	0.1	0.60	0.08	0.18	0.06	0.11	0.06	0.50	0.09	0.83	0.11	0.10	0.07
P21802	FGFR2 HUMAN							-0.24	0.39	-0.10	0.44	-0.32	0.4	-2.66	1.99	-0.30	0.4	0.31	0.4
P09769	FGFR HUMAN	2.28	0.66	-0.07	0.16	0.25	0.16	0.81	0.16	0.86	0.16	-0.06	0.11	0.58	0.21	0.53	0.21	0.26	0.18
O9H479	FN3K HUMAN														0.59	0.45	0.58		
P42345	FRAP HUMAN							-0.99	0.49	-0.21	0.23	-0.40	0.26						
P42683	FRK HUMAN	-0.43	0.13	0.58	0.15	0.04	0.11	-0.79	0.17	-0.31	0.13	-0.58	0.15	0.34	0.24	0.99	0.37	-0.11	0.21
O8N0W3	FUK HUMAN													-0.79	0.17	0.01	0.11	0.07	0.12
P06241	FYN HUMAN	0.76	0.16	-0.39	0.13	-0.19	0.11	0.31	0.1	0.18	0.09	-0.19	0.09	-0.58	0.34	0.82	0.39	0.16	0.25
O14976	GAK HUMAN	-0.74	0.07	-0.82	0.08	-0.08	0.05	-0.11	0.05	-0.62	0.06	0.11	0.05	-0.18	0.06	-0.08	0.06	-0.15	0.15
P51570	GALK1 HUMAN	-0.96	0.5	-0.80	0.46	-0.26	0.3							-0.90	0.32	-0.96	0.32	-0.33	0.21
O8IVS8	GLCTK HUMAN													-0.70	0.54	-0.38	0.42	0.04	0.34
P43250	GRK6 HUMAN													0.51	0.46	-0.38	0.41	0.08	0.34
P49840	GSK3A HUMAN	0.10	0.07	0.89	0.11	-0.21	0.07	-0.29	0.08	0.24	0.07	0.18	0.07	0.32	0.1	0.08	0.09	-0.11	0.09
P49841	GSK3B HUMAN	0.51	0.08	0.99	0.11	-0.07	0.07	0.08	0.08	0.19	0.08	0.16	0.07	0.56	0.1	0.12	0.08	-0.01	0.08
P08631	HCK HUMAN	2.11	0.47	-0.50	0.17	0.00	0.14	1.21	0.16	1.01	0.16	-0.30	0.1	0.25	0.13	0.70	0.16	0.49	0.15
O9UP29	ICK HUMAN													0.61	0.51	0.42	0.43	-0.40	0.42
P08069	IGF1R HUMAN	-0.04	0.09	-0.98	0.16	-0.29	0.1	-1.19	0.19	-0.54	0.12	-0.45	0.11	-0.71	0.17	0.72	0.17	-0.12	0.11
O14164	IKKE HUMAN							-0.01	0.23	0.76	0.33	-0.29	0.25	1.41	0.42	-0.14	0.17	0.30	0.2
O13418	ILK HUMAN	0.97	0.15	-0.90	0.14	0.36	0.1	-0.34	0.06	0.58	0.07	-0.12	0.05	0.16	0.09	0.75	0.12	0.18	0.08
P06213	INSR HUMAN	0.78	0.08	-0.38	0.07	-0.36	0.06	0.66	0.06	0.51	0.06	-0.28	0.05	-0.39	0.08	1.27	0.14	-0.29	0.08
O9Y616	IRAK3 HUMAN	1.83	1.14	-0.31	0.4	0.00	0.34	0.68	0.41	0.40	0.35	-0.04	0.27	0.52	0.36	1.45	0.74	0.07	0.32
O9NWZ3	IRAK4 HUMAN	-0.81	0.55	0.46	27.6	-0.71	0.51	0.31	0.14	0.74	0.2	-0.16	0.13	0.34	0.33	-0.29	0.25	0.44	0.28
P23458	JAK1 HUMAN	0.96	0.22	-0.10	0.13	-0.28	0.14	0.49	0.12	0.18	0.1	0.24	0.1	-0.40	0.15	1.30	0.29	0.21	0.14
P52333	JAK3 HUMAN	-0.06	0.23	0.18	0.23	-0.58	0.31	0.67	0.43	0.21	0.31	0.29	0.33	0.54	0.26	-0.03	0.21	-0.24	0.23
P27144	KAD4 HUMAN							-1.46	0.88	-1.18	0.72	-0.60	0.48	-1.91	1.4	-1.68	1.01	-0.10	0.35
P13861	KAP2 HUMAN													-0.70	0.27	-0.30	0.22	0.01	0.19
P17612	KAPCA HUMAN							-0.14	0.25	-0.43	0.29	0.00	0.24	-0.31	0.6	-0.26	0.39	0.18	0.37
P48729	KC1A HUMAN	-0.19	0.07	0.73	0.1	-0.10	0.07	-0.04	0.05	-0.29	0.06	0.07	0.05	-0.58	0.12	-0.33	0.1	-0.04	0.09
P48730	KCID HUMAN	-0.28	0.08	0.44	0.09	-0.26	0.08	-0.18	0.11	0.03	0.1	-0.01	0.1	0.16	0.09	-0.12	0.09	0.04	0.09
P49674	KCIE HUMAN	0.36	0.09	0.82	0.12	0.14	0.08	0.46	0.18	0.31	0.15	0.45	0.17	0.04	0.1	0.91	0.16	0.06	0.09
O9HCP0	KCIG1 HUMAN	-0.79	0.4	0.72	0.38	-0.34	0.29	-0.21	0.11	-0.24	0.11	0.03	0.11	-0.32	0.4	-0.78	0.54	-0.20	0.39
P78368	KCIG2 HUMAN							0.08	0.37	-0.70	0.51	0.15	0.37	-0.38	0.25	0.14	0.21	0.10	0.19
O9Y6M4	KCIG3 HUMAN	-0.45	0.21	1.45	0.45	-0.44	0.23	-0.07	0.15	0.04	0.16	0.03	0.15	-0.25	0.16	-0.38	0.17	0.14	0.13
Q13554	KCC2B HUMAN	0.86	0.19	3.87	1.7	-0.24	0.12	-2.72	1.56	-0.69	0.25	-0.49	0.21	-2.00	1.26	0.98	0.53	0.21	0.31
Q13557	KCC2D HUMAN	0.54	Exact	1.79	Exact	-0.25	Exact	-0.01	0.04	0.26	Exact	-0.04	Exact	0.04	0.05	1.30	0.1	0.15	0.05
O13555	KCC2G HUMAN	-0.58	0.1	-1.18	0.15	-0.57	0.1	-1.12	0.11	-0.75	0.08	-0.10	0.06	-0.03	0.09	0.08	0.08	0.06	0.08
Q13976	KGP1A HUMAN	0.63	0.19	0.20	0.14	0.01	0.15	-0.92	0.18	-0.95	0.19	0.06	0.11	-1.93	0.54	-0.54	0.19	0.20	0.14
P50053	KHK HUMAN	2.01	0.19	-2.59	3.94	0.50	0.07	1.44	0.11	2.26	0.19	0.14	0.05	-0.50	0.14	0.24	0.1	-0.10	0.1
P10721	KIT HUMAN	0.24	0.09	4.54	4.34	0.80	0.12	-0.66	0.18	-1.21	0.26	0.14	0.14	-1.90	2.88	-0.63	0.16	0.69	0.16
O96RR4	KKCC2 HUMAN													1.18	0.38	0.98	0.33	0.11	0.18
P46019	KPB2 HUMAN	1.87	0.4	0.70	0.17	0.11	0.12	0.63	0.15	0.65	0.15	-0.06	0.11	0.79	0.18	2.54	0.63	-0.10	0.12
O93100	KPBB HUMAN	1.73	0.34	1.38	0.27	0.18	0.12	0.64	0.18	0.58	0.16	-0.03	0.13	0.94	0.19	2.75	0.72	-0.04	0.11
P17252	KPCA HUMAN	-0.82	0.36	-0.81	0.37	0.46	0.28	-0.32	0.18	-0.29	0.18	-0.01	0.19	-0.04	0.18	-1.07	0.33	-0.42	0.22
Q05655	KPCD HUMAN							-0.26	0.56	-0.08	0.35	0.30	0.4	-0.11	0.28	-0.20	0.29	-0.15	0.26
Q15139	KPCD1 HUMAN	0.52	0.12	-1.00	0.18	0.23	0.1	-0.46	0.11	-0.34	0.1	0.07	0.08	-0.82	0.17	0.20	0.13	0.32	0.1
O9BZ16	KPCD2 HUMAN	1.40	0.2	-0.50	0.12	0.16	0.09	0.29	0.08	0.03	0.07	-0.06	0.07	0.61	0.14	0.76	0.15	-0.07	0.1
O94806	KPCD3 HUMAN	0.54	0.25	-0.70	0.29	0.06	0.19	0.26	0.18	-0.33	0.19	0.08	0.16	0.60	0.33	0.25	0.27	-0.03	0.26
Q04759	KPCT HUMAN													-0.31	0.27	-1.14	0.53	0.06	0.27
P11801	KPSH1 HUMAN							-0.30	0.4	-1.63	0.78	0.46	0.37						
P14618	KPYM HUMAN	1.12	0.45	0.38	0.24	0.45	0.28	0.16	0.13	0.70	0.19	0.01	0.13	1.21	0.2	1.13	0.19	-0.04	0.1
Q15418	KS6A1 HUMAN	-0.15	0.09	-0.07	0.08	-0.12	0.08	-0.52	Exact	0.10	Exact	0.03	Exact	-1.21	0.12	0.49	0.08	0.04	0.06

Q15349	KS6A2 HUMAN	0.00	0.54	-0.48	0.63	-0.20	0.55	-0.30	0.38	-0.43	0.36	-0.30	0.32	-0.72	0.28	0.28	0.2	0.08	0.19
P51812	KS6A3 HUMAN	0.82	0.09	1.42	0.13	0.00	0.06	0.65	0.06	0.88	0.07	-0.01	0.05	0.57	0.08	1.08	0.11	0.04	0.06
O75676	KS6A4 HUMAN													1.18	0.46	1.14	0.45	-0.03	0.23
P43405	KS7K HUMAN	1.28	0.26	0.03	0.13	0.41	0.14	0.10	0.11	0.37	0.14	-0.28	0.13	-0.08	0.12	0.30	0.12	0.46	0.14
Q9HA64	KT3K HUMAN	1.07	0.11	-0.43	0.08	-0.07	0.06	0.45	0.05	0.15	0.05	-0.23	0.05	0.62	0.08	0.58	0.08	-0.33	0.06
O95835	LATS1 HUMAN							-1.32	0.78	-0.84	0.44	-0.19	0.3						
P06239	LCK HUMAN							0.37	0.18	0.42	0.19	-0.40	0.18	0.15	0.18	0.46	0.22	0.20	0.18
P53667	LMK1 HUMAN	1.28	0.31	-0.14	0.14	-0.04	0.15	0.58	0.13	0.70	0.15	-0.26	0.12	1.50	0.26	0.11	0.11	-0.04	0.11
P53671	LMK2 HUMAN	1.28	1.06	0.48	0.62	0.07	0.48	0.62	0.25	0.74	0.29	-0.16	0.2						
O55007	LRK2 HUMAN	1.77	0.68	-0.94	0.4	0.08	0.23	1.60	0.26	0.31	0.11	0.28	0.11	0.69	0.23	1.35	0.37	-0.03	0.16
P07948	LYN HUMAN	0.70	0.11	-0.12	0.08	-0.03	0.08	0.39	0.06	0.12	0.05	0.19	0.05	0.24	0.09	0.04	0.08	0.00	0.08
Q13233	M3K1 HUMAN							0.29	0.25	-0.19	0.22	0.03	0.23	0.58	0.21	0.46	0.19	0.07	0.18
Q16584	M3K11 HUMAN	0.44	0.13	-0.18	0.12	-0.24	0.12	1.01	0.14	0.21	0.08	0.03	0.08	0.79	0.13	0.43	0.1	0.07	0.09
Q9Y2U5	M3K2 HUMAN	0.33	0.12	0.31	0.12	-0.14	0.11	0.65	0.14	0.51	0.13	0.08	0.1	0.45	0.16	0.28	0.14	-0.16	0.15
Q99759	M3K3 HUMAN	1.14	0.24	0.06	0.13	0.32	0.14	0.36	0.15	0.08	0.14	0.10	0.13	0.08	0.16	0.62	0.16	0.12	0.11
Q99683	M3K5 HUMAN	1.58	0.27	0.77	0.15	0.14	0.1	0.21	0.09	0.25	0.09	-0.29	0.09	0.82	0.16	0.70	0.14	-0.15	0.11
Q95382	M3K6 HUMAN	0.88	0.51	0.36	0.31	0.08	0.27	0.36	0.26	0.86	0.38	-0.30	0.25	1.00	0.35	1.06	0.32	-0.03	0.2
Q5TCX8	M3KL4 HUMAN													-0.11	0.38	-0.01	0.36	0.19	0.38
Q92918	M4K1 HUMAN	1.16	0.7	1.07	0.67	0.12	0.37	-0.16	0.36	0.66	0.39	-0.36	0.32	-0.31	0.23	0.32	0.22	0.08	0.2
O12851	M4K2 HUMAN							-0.11	0.18	-0.15	0.19	-0.24	0.2	0.53	0.29	-0.23	0.23	-0.01	0.23
Q81VH8	M4K3 HUMAN	-0.96	0.17	-0.46	0.12	-0.03	0.1	-0.40	0.08	-0.58	0.09	0.07	0.07	-0.31	0.12	-0.38	0.13	0.11	0.11
Q95819	M4K4 HUMAN	0.93	0.28	0.07	0.17	0.37	0.19	1.10	0.2	0.70	0.16	-0.20	0.12	1.10	0.22	0.74	0.16	-0.03	0.11
Q9Y4K4	M4K5 HUMAN	0.06	0.4	0.42	0.42	0.15	0.37	-0.34	0.14	-0.26	0.13	-0.08	0.13	-0.31	0.18	-0.04	0.15	0.12	0.15
Q81W41	MAPK5 HUMAN							0.11	0.09	0.68	0.13	0.21	0.1						
Q9P0L2	MARK1 HUMAN	-0.18	0.37	0.29	0.4	0.54	0.47	-0.62	0.25	-0.45	0.22	0.11	0.19	-1.32	0.26	-0.43	0.14	0.30	0.12
O7KZ17	MARK2 HUMAN	-0.34	0.07	0.69	0.08	-0.06	0.06	0.18	0.06	0.04	0.06	0.14	0.06	0.19	0.06	0.39	0.07	0.28	0.06
P27448	MARK3 HUMAN	-0.39	0.11	1.21	0.18	0.14	0.09	-0.57	0.11	-0.67	0.11	0.10	0.08	-0.26	0.09	0.12	0.09	0.28	0.1
Q12866	MERTK HUMAN	-0.10	0.13	0.72	0.17	0.08	0.12	0.55	0.14	-0.25	0.11	0.01	0.11	-0.51	0.14	0.11	0.12	0.06	0.12
P08581	MET HUMAN	1.18	0.3	2.97	1.05	0.48	0.21	1.07	0.24	1.26	0.28	-0.26	0.14	2.43	0.36	1.11	0.15	-0.25	0.09
P28482	MK01 HUMAN	1.26	Exact	0.14	Exact	0.03	Exact	0.28	Exact	0.90	Exact	0.08	Exact	0.10	Exact	1.74	0.11	0.04	Exact
P27361	MK03 HUMAN	1.37	0.1	0.01	0.05	0.34	0.05	0.21	Exact	0.23	Exact	0.15	Exact	0.25	0.06	1.22	0.12	0.14	0.06
Q13164	MK07 HUMAN	-0.12	0.36	0.00	0	-0.24	0.38	0.08	0.2	0.18	0.21	0.04	0.21	0.88	0.28	0.06	0.18	0.10	0.17
P45983	MK08 HUMAN	-0.25	0.15	-1.74	0.45	-0.58	0.19	-0.65	0.11	-0.36	0.09	-0.20	0.08	-0.40	0.16	0.37	0.16	0.06	0.14
P45984	MK09 HUMAN	0.73	0.14	0.64	0.13	-0.07	0.1	0.50	0.08	0.70	0.1	0.06	0.07	0.20	0.1	0.39	0.12	-0.10	0.1
P53779	MK10 HUMAN	-0.76	0.29	-0.21	0.21	-0.24	0.2	-1.14	0.24	-0.64	0.18	-0.37	0.14	-1.88	0.54	-0.56	0.22	-0.01	0.17
O15264	MK13 HUMAN	0.60	0.25	0.94	0.32	0.31	0.2	-0.25	0.11	0.26	0.1	-0.20	0.1	-0.83	0.16	-0.01	0.1	0.26	0.11
Q16539	MK14 HUMAN							0.65	0.49	0.30	0.4	-0.07	0.34						
Q8TD08	MK15 HUMAN	1.79	0.34	0.31	0.13	0.26	0.12	0.43	0.09	1.01	0.14	0.15	0.08	0.20	0.29	0.99	0.45	0.11	0.27
Q9NYL2	MLTK HUMAN	1.40	0.31	-0.14	0.13	0.14	0.14	0.15	0.1	0.60	0.13	0.14	0.1	1.38	0.33	0.42	0.17	-0.08	0.14
Q02750	MP2K1 HUMAN	0.98	0.27	1.41	0.34	0.61	0.2	0.40	0.1	0.11	0.09	0.18	0.09	0.20	0.16	0.67	0.23	0.23	0.16
P36507	MP2K2 HUMAN	2.09	0.85	2.09	0.88	0.32	0.26	0.73	0.16	0.06	0.1	-0.03	0.11	0.39	0.59	0.99	0.66	0.32	0.58
P46734	MP2K3 HUMAN							-0.06	0.18	-0.16	0.18	0.00	0.19	0.48	0.34	0.16	0.3	-0.04	0.3
P52564	MP2K6 HUMAN	1.03	0.15	-0.86	0.14	0.03	0.08	0.00	0.09	-0.10	0.09	0.07	0.1	0.19	0.1	0.90	0.15	0.06	0.09
O14733	MP2K7 HUMAN							0.08	0.35	0.23	0.38	0.04	0.34	-0.31	0.4	0.16	0.46	0.16	0.37
Q9Y552	MRCKB HUMAN	0.18	0.07	0.56	0.09	0.12	0.07	-0.01	0.05	-0.36	0.06	-0.24	0.05	0.30	0.09	0.69	0.11	-0.10	0.08
Q86YV6	MYLK4 HUMAN													-0.20	0.38	0.23	0.38	-0.03	0.34
Q15746	MYLK HUMAN	0.21	0.21	0.01	0.19	-0.04	0.2	-0.06	0.12	0.16	0.13	-0.06	0.11	-1.26	0.5	-0.23	0.25	-0.03	0.25
Q9UJ70	NAGK HUMAN	1.06	0.67	0.16	27.6	-0.38	0.42	0.81	0.33	0.49	0.26	-0.33	0.24	-0.06	0.15	0.41	0.17	0.07	0.14
Q96PY6	NEK1 HUMAN							0.45	0.37	0.23	0.32	0.11	0.31	0.44	0.19	0.58	0.21	0.03	0.16
Q8P3R8	NEK5 HUMAN							1.32	0.56	1.53	0.64	-0.45	0.52						
Q8TD19	NEK9 HUMAN	0.70	Exact	0.92	Exact	-0.19	Exact	-0.10	0.04	-0.37	Exact	-0.06	Exact	0.00	0.05	0.46	0.06	0.10	0.05
Q9UBE8	NLK HUMAN													0.16	0.25	0.00	0.22	0.08	0.23
O60285	NUAK1 HUMAN	0.11	0.29	-0.14	0.29	0.03	0.34							0.70	0.41	0.34	0.34	0.21	0.33
Q9H093	NUAK2 HUMAN																		
Q95747	OXSR1 HUMAN							-1.49	0.58	-2.36	1.03	0.68	0.26	-1.02	0.66	-1.19	0.72	0.16	0.37
O00443	P3C2A HUMAN							0.00	0.25	-0.23	0.24	0.16	0.23	0.24	0.14	0.16	0.14	0.16	0.14

Q96013	PAK4 HUMAN	-0.37	0.05	1.53	0.11	-0.14	0.05	0.01	0.06	-0.19	0.05	0.19	0.05	0.20	0.06	-0.32	0.06	0.06	0.05
Q9NV67	PANK4 HUMAN													-1.15	0.7	0.50	0.46	0.31	0.4
Q00536	PCTK1 HUMAN	0.16	0.08	-0.34	0.09	0.11	0.08	-0.08	0.07	-0.30	0.07	0.23	0.07	0.73	0.12	-0.15	0.08	-0.29	0.09
Q00537	PCTK2 HUMAN	0.92	0.2	-0.36	0.13	0.06	0.12	0.48	0.08	0.32	0.07	0.06	0.07	0.34	0.13	0.54	0.15	0.01	0.11
Q007002	PCTK3 HUMAN	2.22	0.23	-1.89	0.19	0.16	0.06	0.88	0.07	0.94	0.08	-0.04	0.05	0.82	0.1	2.14	0.25	-0.21	0.07
Q15118	PDK1 HUMAN													0.77	0.54	1.98	1.24	-0.10	0.35
Q15119	PDK2 HUMAN	-0.96	0.52	-0.53	0.37	-0.42	0.35	-1.57	0.94	-1.31	0.67	0.06	0.35	-1.00	0	-1.00	0	0	0
Q15120	PDK3 HUMAN	-0.77	0.45	-0.42	0.36	-0.54	0.38	-0.64	0.41	-0.77	0.44	-0.67	0.41	-0.79	0.29	-0.49	0.24	-0.12	0.19
Q15530	PDPK1 HUMAN	1.04	0.64	0.90	0.59	0.28	0.39	0.53	0.33	0.58	0.32	0.03	0.22						
Q00764	PDCK HUMAN	-0.41	Exact	-1.00	Exact	0.15	Exact	-1.16	0.05	-0.59	Exact	0.30	Exact	-0.96	0.07	-0.80	0.07	-0.16	Exact
Q94921	PCTK1 HUMAN	1.04	0.19	-0.68	0.18	-0.70	0.19	0.40	0.14	0.11	0.1	0.18	0.1	-0.58	0.2	0.76	0.22	-0.20	0.15
P00558	PGK1 HUMAN													1.13	0.38	0.99	0.36	0.12	0.19
P09619	PGFRB HUMAN	0.01	0.33	-0.72	0.71	-0.25	0.39							-1.85	0.8	-0.59	0.34	0.16	0.26
P15735	PHKG2 HUMAN	1.79	0.37	1.48	0.31	0.16	0.12	0.48	0.15	0.25	0.13	0.08	0.11	0.65	0.19	2.87	0.9	0.00	0.14
P42356	PL4KA HUMAN	0.23	0.24	0.84	0.38	0.34	0.26							-0.07	0.21	0.36	0.23	0.10	0.19
Q00329	PK3CD HUMAN	2.34	0.62	-0.14	0.14	0.30	0.15	0.74	0.1	0.74	0.11	-0.44	0.09	-0.13	0.96	-0.46	0.61	0.25	0.56
Q16513	PKN2 HUMAN	-0.44	0.43	1.41	0.84	0.14	0.36							-1.13	0.11	0.48	0.13	0.15	0.11
P78527	PRKDC HUMAN	1.20	0.36	0.43	0.24	0.00	0.2	0.11	0.27	0.30	0.28	-0.25	0.27	0.23	0.11	0.48	0.13	0.15	0.11
Q96584	PRPK HUMAN	-0.18	0.05	0.54	0.06	-0.26	0.05	-0.11	0.06	-0.12	0.07	0.01	0.06	-0.53	0.08	-0.33	0.07	0.03	0.07
Q9BV54	RIOK2 HUMAN			0.07	0			1.34	0.27	1.50	0.3	0.00	0.12	1.07	0.26	0.28	0.16	0.32	0.15
Q43353	RIPK2 HUMAN	1.06	0.2	0.69	0.15	-0.11	0.11	0.49	0.1	0.81	0.12	-0.14	0.08	2.22	0.39	0.30	0.11	-0.23	0.11
Q13464	ROCK1 HUMAN	0.79	0.24	-0.38	0.19	0.14	0.16	-0.43	0.1	0.30	0.1	-0.10	0.09	-0.29	0.07	0.34	0.08	0.14	0.07
Q75116	ROCK2 HUMAN	0.26	0.12	0.77	0.16	0.36	0.12	0.50	0.14	-0.33	0.13	0.14	0.11	0.86	0.14	0.19	0.09	-0.04	0.09
Q00141	SGK1 HUMAN													0.26	0.39	0.18	0.37	0.41	0.42
Q9H2G2	SLK HUMAN	-0.04	0.13	0.31	0.14	-0.01	0.13	-0.26	0.12	0.00	0.11	-0.30	0.11	0.23	0.09	-0.32	0.09	0.08	0.09
Q9H0K1	SNL2 HUMAN	0.48	0.19	0.00	0.16	-0.34	0.19	0.41	0.13	0.00	0.11	-0.04	0.11	0.84	0.16	1.16	0.19	-0.01	0.1
P12931	SIRC HUMAN	-0.07	0.06	0.54	0.08	-0.24	0.06	-0.03	0.07	-0.03	0.06	-0.03	0.06	1.06	0.13	0.21	0.07	0.06	0.07
Q94804	STK10 HUMAN																		
Q15831	STK11 HUMAN	0.32	0.34	0.31	0.33	-0.04	0.29	-0.34	0.33	0.18	0.33	-0.21	0.29	-0.01	0.22	-0.11	0.22	-0.07	0.2
Q75716	STK16 HUMAN	0.11	0.36	0.23	0.45	0.04	0.33	0.23	0.09	0.20	0.09	0.16	0.09	0.58	0.24	0.85	0.25	-0.11	0.19
Q9Y6B0	STK24 HUMAN	-0.03	0.28	0.89	0.48	0.82	0.46							0.28	0.39	-0.19	0.38	0.23	0.37
Q13188	STK3 HUMAN	0.03	0.09	3.14	0.7	-0.08	0.09	-0.19	0.07	0.03	0.07	0.21	0.07	0.01	0.09	0.46	0.11	0.36	0.1
Q9BYT3	STK33 HUMAN	-0.89	0.82	1.51	1.24	-0.10	0.5	1.02	0.37	-1.02	0.45	0.16	0.21	-2.31	1.58	-1.69	1.02	0.36	0.41
Q13043	STK4 HUMAN	1.31	0.23	1.33	0.22	-0.11	0.1	0.62	0.1	0.81	0.12	-0.03	0.08	1.22	0.21	0.93	0.18	0.06	0.11
Q14965	STK6 HUMAN													1.70	1.02	0.04	0.39	0.14	0.36
Q7L7X3	TAOK1 HUMAN	0.31	0.12	0.44	0.13	0.11	0.1	-0.30	0.08	0.31	0.08	0.07	0.07	1.01	0.14	0.11	0.08	0.07	0.08
Q9UL54	TAOK2 HUMAN	0.18	0.16	-0.16	0.16	0.06	0.14	0.11	0.1	-0.03	0.1	-0.14	0.09	0.04	0.17	0.38	0.19	0.14	0.17
Q9H2K8	TAOK3 HUMAN	0.70	0.33	0.66	0.32	0.31	0.25	-0.10	0.12	0.32	0.13	-0.29	0.12	0.18	0.14	0.61	0.2	0.20	0.15
Q9UHD2	TBK1 HUMAN	0.28	0.06	-0.58	0.07	-0.28	0.06	0.14	0.05	-0.06	0.05	-0.10	0.05	0.26	0.06	0.24	0.06	-0.03	0.06
P42680	TFC HUMAN	0.23	0.18	0.70	0.24	-0.53	0.21	0.28	0.12	0.42	0.13	-0.29	0.13	1.05	0.17	0.79	0.15	-0.14	0.1
P36897	TGFR1 HUMAN													0.82	0.47	0.31	0.34	-0.24	0.32
P37173	TGFR2 HUMAN	0.75	0.19	0.21	0.13	-0.26	0.14	0.19	0.1	-0.25	0.11	-0.12	0.11	-1.16	0.26	0.68	0.19	0.21	0.14
Q02763	TIE2 HUMAN	-0.14	0.18	-0.77	0.29	-0.07	0.17	-0.40	0.15	-0.68	0.17	-0.25	0.14	-1.78	0.44	-0.45	0.18	0.04	0.13
Q9UK18	TLK1 HUMAN							-0.99	0.64	-0.04	0.38	-0.43	0.43	0.11	0.24	0.25	0.25	0.20	0.24
Q86UE8	TLK2 HUMAN							0.04	0.37	0.12	0.43	0.04	0.34	0.19	0.21	0.20	0.21	0.15	0.19
Q9UKES	TNIK HUMAN	0.11	0.17	0.73	0.23	-0.33	0.17	0.04	0.13	0.78	0.19	-0.38	0.14	0.23	0.13	0.06	0.12	0.03	0.12
Q13470	TNK1 HUMAN													0.00	0.2	0.37	0.26	-0.10	0.19
Q96KB5	TOPK HUMAN							0.55	0.33	0.33	0.29	0.04	0.24		0.8		0.63		0.5
Q6SA08	TSSK4 HUMAN							-1.99	1.27	-0.48	0.44	-0.51	0.45						
P42681	TXK HUMAN	-0.30	0.4	0.06	27.6	-0.32	0.4	-1.54	0.93	-0.16	0.37	-0.18	0.37		0.52		0.5		0.53
Q6PHR2	ULK3 HUMAN	0.07	0.17	0.64	0.22	-0.43	0.19	-0.01	0.15	0.36	0.15	0.44	0.17	-0.44	0.34	1.68	0.86	0.34	0.32
P35916	VGFR3 HUMAN	1.33	0.27	-0.28	0.14	-0.14	0.12	0.55	0.16	0.59	0.16	-0.08	0.12	-0.66	0.15	1.84	0.33	0.23	0.11
Q86Y07	VRK2 HUMAN				27.6		0.62	0.36	0.22	-0.08	0.18	-0.15	0.18	1.37	0.7	0.74	0.45	0.20	0.3
P30291	WEE1 HUMAN													-0.07	0.36	0.06	0.35	0.15	0.37
P07947	YES HUMAN	-0.72	0.13	-0.58	0.12	-0.36	0.1	-0.41	0.11	-0.29	0.1	-0.10	0.09	-0.53	0.18	-0.07	0.14	0.04	0.13

Tabelle 7-3: Phosphorylierungsstellen mit Regulationsfaktoren

Uniprot	Proteinname	Studie	P-Stelle	NT003	NT002	NT004	NT007	NT011	NT008	Uniprot	Proteinname	Studie	P-Stelle	NT003	NT002	NT004	NT007	NT011	NT008
Q2M218	AAK1_HUMAN	III	S18					1.00	2.21	Q9YSS2	MIRCKB_HUMAN	III	S1690					~3	1.90
Q2M218	AAK1_HUMAN	II/III	S21	1.14	-1.46	1.50	-1.50	-1.30	-1.36	Q9YSS2	MIRCKB_HUMAN	III	T676					2.99	2.19
Q2M218	AAK1_HUMAN	I	S624	-1.08	-3.82					Q9YSS2	MIRCKB_HUMAN	II/III	S481		2.56 / 1.12	74 / -1		1.63	1.59
Q2M218	AAK1_HUMAN	III	S637					5.10	1.54	Q15131	CDK10_HUMAN	III	T350					-1.01	2.42
Q2M218	AAK1_HUMAN	III	S652/T653					2.88	2.04	Q00535	CDK5_HUMAN	III	T17		1.46			1.48	2.51
Q2M218	AAK1_HUMAN	II	S668/T674			4.65	2.55			Q50613	CDK7_HUMAN	II/III	S164	1.05	1.04	1.44	1.41		
Q2M218	AAK1_HUMAN	II	S670/T674		1.30	4.35	2.99			Q50613	CDK9_HUMAN	II/III	T170	1.21	1.16	1.27	1.19	-1.11	2.32
Q2M218	AAK1_HUMAN	II/III	S678	2.16	-1.54	3.72	1.82	2.22	1.44	Q50750	CDK9_HUMAN	III	S347					-1.33	2.79
Q2M218	AAK1_HUMAN	III	T389					-1.15	1.84	Q50750	CDK9_HUMAN	II/III	T186	4.05	1.41	1.70	1.35		
Q2M218	AAK1_HUMAN	III	T606	1.05	-1.19			2.01	3.47	Q76039	CDKL5_HUMAN	I	S306	-3.07	-1.35				
Q2M218	AAK1_HUMAN	II/III	T620	1.2	-1.7	2.12	2.11	1.20	-1.88	Q76039	CDKL5_HUMAN	II/III	S343			2.95	1.86	2.45	2.45
Q2M218	AAK1_HUMAN	I	T674/S676			6.97	2.20			Q76039	CDKL5_HUMAN	III	T174					1.48	1.04
Q2M218	AAK1_HUMAN	II	T674/S678	2.24	1.29					Q76039	CDKL5_HUMAN	III	Y171					2.86	2.69
P00519	ABL1_HUMAN	II	S180			-1.10	-2.17			Q9Y259	CHKB_HUMAN	II	S39540			1.25	-1.86		
P42684	ABL2_HUMAN	III	S602					4.03	4.00	P49760	CLK2_HUMAN	III	S30					-1.15	1.96
P42684	ABL2_HUMAN	II/III	S620	-1.25	1.58	2.39	-1.64	2.27	5.01	P48729	KC1A_HUMAN	III	S312					1.40	~3
P42684	ABL2_HUMAN	II/III	S631			2.04	1.57	4.03	3.01	P48729	KC1A_HUMAN	III	T321					1.10	1.27
P42684	ABL2_HUMAN	III	S781					1.16	1.43	P48729	KC1A_HUMAN	III	S218/S217					-1.27	-1.75
P42684	ABL2_HUMAN	III	S783					7.00	5.70	P48730	KCID_HUMAN	I	S328/S331	-1.27	-1.34				
P42684	ABL2_HUMAN	II	S819/S820			3.26	1.77	5.78	4.04	P48730	KCID_HUMAN	II/III	S331	-1.02	-1.15	1.48	-1.81	-1.16	2.39
P42684	ABL2_HUMAN	III	S820					4.88	3.88	P48730	KCID_HUMAN	II/III	S382	1.17	-1.76	1.07	-1.42	-1.06	1.73
P42684	ABL2_HUMAN	III	S936					1.56	7.62	P48730	KCID_HUMAN	I	S384	1.34	-1.19				
Q9NSY1	BMP2K_HUMAN	III	S1029/S1					1.37	2.08	P49674	KC1E_HUMAN	II/III	S363	1.66	1.58	1.92	1.16	2.23	1.40
Q9NSY1	BMP2K_HUMAN	III	S14					2.50	-1.26	P49674	KC1E_HUMAN	II/III	S389	1.33	-1.25	1.73	-1.14	1.38	1.31
Q9NSY1	BMP2K_HUMAN	III	S715			2.99	1.25	kein N		P49674	KC1E_HUMAN	III	S405/S408					2.57	1.63
Q9NSY1	BMP2K_HUMAN	III	S824/T829					kein N		P78368	KC1G2_HUMAN	III	S33					-1.00	1.17
Q9NSY1	BMP2K_HUMAN	III	S949					4.46	1.35	Q9Y6M4	KC1G3_HUMAN	II/III	S31	-1.71	-1.43			-1.84	1.67
Q9NSY1	BMP2K_HUMAN	III	T1000					1.34	3.51	Q9Y6M4	KC1G3_HUMAN	II/III	S344	1.07	-1.46			-1.01	1.76
Q13554	KCC2B_HUMAN	II	S315			-2.30	-2.52			P19784	CSK22_HUMAN	II/III	S18	2.15	1.09	-1.03	-1.08	1.33	3.45
Q13554	KCC2B_HUMAN	II/III	T287	15.39	-3.24	kein T	-4.04			P67870	CSK2B_HUMAN	III	S209					2.01	-1.03
Q13554	KCC2B_HUMAN	II/III	S367	4.07	-2.02	-20.48	-8.55	-1.47	-20.23	Q13627	DYR1A_HUMAN	III	S299					2.28	2.12
Q13557	KCC2D_HUMAN	I	S264	6.3	1.34					P21709	EPHA1_HUMAN	III	S908					-3.84	-9.97
Q13557	KCC2D_HUMAN	II/III	S315/S319			-3.20	-1.28	1.23	1.08	P29317	EPHA2_HUMAN	II/III	S897	1.38	-1.1	1.71	-3.06	1.19	-1.53
Q13557	KCC2D_HUMAN	II	S330			1.58	1.78			P29317	EPHA2_HUMAN	II/III	S897/S901	1.03	1.16				
Q13557	KCC2D_HUMAN	II/III	S333	4.04	2.24	1.15	1.40	3.62	1.31	P29317	EPHA2_HUMAN	II/III	S901	-1.77	1.08	1.48	-3.70	-1.43	1.39
Q13557	KCC2D_HUMAN	I	S333T334	2.42	2.67					P29317	EPHA2_HUMAN	III	T387Y594					1.17	2.28
Q13557	KCC2D_HUMAN	I	S333T336	2.20	3.48	-1.33	1.31	2.53	1.12	P29317	EPHA2_HUMAN	II/III	Y575	1.09	1.92	3.46	-1.09	1.43	3.66
Q13557	KCC2D_HUMAN	I	S333T337	2.8	2.67					P29317	EPHA2_HUMAN	III	Y594					1.97	3.23
Q13557	KCC2D_HUMAN	II/III	S334	4.98	1.94	1.06	1.25	2.43	1.71	P29317	EPHA2_HUMAN	II/III	Y772	1.45	1.93			1.52	2.75
Q13557	KCC2D_HUMAN	III	S490					2.84		Q15375	EPHA7_HUMAN	III	Y791					1.07	2.54
Q13557	KCC2D_HUMAN	II/III	T336	4.91	2.00			2.49	1.14	P29323	EPHB2_HUMAN	II/III	S575	-1.95	-1.7			-3.99	-1.02
Q13557	KCC2D_HUMAN	II/III	T337	4.09	2.15	1.14	1.20	3.84	1.51	P29323	EPHB2_HUMAN	II/III	S776					-20.10	-1.30
Q13555	KCC2G_HUMAN	II/III	S311	-1.97	1.07			3.02	4.57	P29323	EPHB2_HUMAN	III	S897/S89					-19.33	-7.05
Q13555	KCC2G_HUMAN	II/III	S381	-3.81	1.27	-1.03	-1.03	1.75	1.99	P54760	EPHB4_HUMAN	III	S769					1.66	-1.02
Q13555	KCC2G_HUMAN	II/III	S419	-2.41	4.27	-1.09	-1.09	2.09	2.55	P54760	EPHB4_HUMAN	III	Y614					1.39	1.21
Q13555	KCC2G_HUMAN	II/III	T287	-3.36	-6.61	-2.32	-2.73			P42685	FRK_HUMAN	III	S37					1.17	~1
Q13555	KCC2G_HUMAN	II/III	T382	-2.67	1.15	-1.39	1.23	2.27	2.49	P42685	FRK_HUMAN	III	S40					1.51	3.31

Uniprot	Proteinname	Studie	I-Stelle	NT003	NT002	NT004	NT007	NT011	NT008
P42685	PRK_HUMAN	I	S62	-3.91	-10.39				
P42685	PRK_HUMAN	III	S92					1.09	-3.80
P06241	PRK_HUMAN	I/II/III	S21	-1.14	1.59	1.09	1.02	4.20	-1.41
P06241	PRK_HUMAN	III	S21S25					-1.07	3.35
P06241	PRK_HUMAN	III	S21S26					-1.35	3.64
P06241	PRK_HUMAN	I/II/III	S25			1.34	-1.19	2.41	1.33
P06241	PRK_HUMAN	III	S257	-2.97	1.00			-2.47	1.97
P06241	PRK_HUMAN	II	S26			-1.16	-1.33		
P49840	GSK3A_HUMAN	I/II/III	S21			2.22	1.90	3.32	4.16
P49840	GSK3A_HUMAN	III	S21S39					kein N	kein N
P49840	GSK3A_HUMAN	III	S39					3.05	1.90
P49840	GSK3A_HUMAN	III	S41					3.46	3.51
P49840	GSK3A_HUMAN	III	T19					kein N	kein N
P49840	GSK3B_HUMAN	III	S25					-1.42	1.37
P49841	GSK3B_HUMAN	I/II/III	S419		1.19			1.36	1.80
P49841	GSK3B_HUMAN	II/III	S9			1.95	2.10	2.99	5.30
P49841	GSK3B_HUMAN	I/II/III	T390	-5.05	-1.29	-2.59	-5.88	-1.39	-1.50
P49841	GSK3B_HUMAN	III	T8					2.64	5.70
P08631	HCK_HUMAN	III	T36					1.22	7.22
Q14164	IKKE_HUMAN	I/II	S664		2.49			1.16	2.45
P06213	INSR_HUMAN	III	S1347		2.77			2.90	1.47
P53667	LIMK1_HUMAN	III	S210					1.03	2.06
P53667	LIMK1_HUMAN	I/II/III	S310	-1.09	1.31	2.62	-1.29	-1.28	>8.7
P53671	LIMK2_HUMAN	II	S289			2.88	1.08		
Q5S007	LRKK2_HUMAN	III	S935					7.56	1.92
Q5S007	LRKK2_HUMAN	I/II	S955	-1.02	10			4.87	1.93
P07948	LYN_HUMAN	I/II/III	S11		1.74	1.67	1.20	1.75	2.10
P07948	LYN_HUMAN	I/II/III	S13	-1.38	1.93	2.29	1.12	1.58	2.13
P07948	LYN_HUMAN	II	S38		-1.36	-1.10	-1.21		
P07948	LYN_HUMAN	II	T160			4.04	1.63		
P07948	LYN_HUMAN	III	Y473					1.34	-1.20
P36507	MP2K2_HUMAN	I/II/III	T394/T396	2.7	3.86	2.32	1.05	4.23	2.67
P52564	MP2K6_HUMAN	III	T28					1.63	3.86
Q13233	M3K1_HUMAN	III	S923	1.12	1.74			1.93	2.95
Q13233	M3K1_HUMAN	III	S1018					1.14	3.82
Q16584	M3K11_HUMAN	I/II/III	S507	1.13	1.54	3.35	-1.28	1.05	11.55
Q16584	M3K11_HUMAN	III	S524		1.93			1.06	10.25
Q16584	M3K11_HUMAN	III	S705					2.70	8.84
Q16584	M3K11_HUMAN	I/II/III	S740	-1.25	1.56	2.05	-1.29	1.69	3.29
Q16584	M3K11_HUMAN	III	T752					-1.03	4.38
Q9Y205	M3K2_HUMAN	I/II/III	S153	-1.48	.42 / 2.7	3.57	2.94	2.93	3.36
Q9Y205	M3K2_HUMAN	III	S163					1.19	1.48
Q9Y205	M3K2_HUMAN	II/III	S239			kein T	-1.06	1.53	-1.03
Q9Y205	M3K2_HUMAN	III	S331					1.33	-1.10
Q9Y205	M3K2_HUMAN	III	S147					-1.21	-1.12
Q9Y205	M3K2_HUMAN	III	S166					1.92	1.81
Q9Y205	M3K3_HUMAN	I/II/III	S176	1.13	1.77	1.37	-1.18	1.59	1.50
Q9Y205	M3K3_HUMAN	I/II	S250	-1.01	1.71	1.54	-1.20		
P42685	PRK_HUMAN	I	S62	-3.91	-10.39				
P42685	PRK_HUMAN	III	S92					1.09	-3.80
P06241	PRK_HUMAN	I/II/III	S21	-1.14	1.59	1.09	1.02	4.20	-1.41
P06241	PRK_HUMAN	III	S21S25					-1.07	3.35
P06241	PRK_HUMAN	III	S21S26					-1.35	3.64
P06241	PRK_HUMAN	I/II/III	S25			1.34	-1.19	2.41	1.33
P06241	PRK_HUMAN	III	S257	-2.97	1.00			-2.47	1.97
P06241	PRK_HUMAN	II	S26			-1.16	-1.33		
P49840	GSK3A_HUMAN	I/II/III	S21			2.22	1.90	3.32	4.16
P49840	GSK3A_HUMAN	III	S21S39					kein N	kein N
P49840	GSK3A_HUMAN	III	S39					3.05	1.90
P49840	GSK3A_HUMAN	III	S41					3.46	3.51
P49840	GSK3A_HUMAN	III	T19					kein N	kein N
P49840	GSK3B_HUMAN	III	S25					-1.42	1.37
P49841	GSK3B_HUMAN	I/II/III	S419		1.19			1.36	1.80
P49841	GSK3B_HUMAN	II/III	S9			1.95	2.10	2.99	5.30
P49841	GSK3B_HUMAN	I/II/III	T390	-5.05	-1.29	-2.59	-5.88	-1.39	-1.50
P49841	GSK3B_HUMAN	III	T8					2.64	5.70
P08631	HCK_HUMAN	III	T36					1.22	7.22
Q14164	IKKE_HUMAN	I/II	S664		2.49			1.16	2.45
P06213	INSR_HUMAN	III	S1347		2.77			2.90	1.47
P53667	LIMK1_HUMAN	III	S210					1.03	2.06
P53667	LIMK1_HUMAN	I/II/III	S310	-1.09	1.31	2.62	-1.29	-1.28	>8.7
P53671	LIMK2_HUMAN	II	S289			2.88	1.08		
Q5S007	LRKK2_HUMAN	III	S935					7.56	1.92
Q5S007	LRKK2_HUMAN	I/II	S955	-1.02	10			4.87	1.93
P07948	LYN_HUMAN	I/II/III	S11		1.74	1.67	1.20	1.75	2.10
P07948	LYN_HUMAN	I/II/III	S13	-1.38	1.93	2.29	1.12	1.58	2.13
P07948	LYN_HUMAN	II	S38		-1.36	-1.10	-1.21		
P07948	LYN_HUMAN	II	T160			4.04	1.63		
P07948	LYN_HUMAN	III	Y473					1.34	-1.20
P36507	MP2K2_HUMAN	I/II/III	T394/T396	2.7	3.86	2.32	1.05	4.23	2.67
P52564	MP2K6_HUMAN	III	T28					1.63	3.86
Q13233	M3K1_HUMAN	III	S923	1.12	1.74			1.93	2.95
Q13233	M3K1_HUMAN	III	S1018					1.14	3.82
Q16584	M3K11_HUMAN	I/II/III	S507	1.13	1.54	3.35	-1.28	1.05	11.55
Q16584	M3K11_HUMAN	III	S524		1.93			1.06	10.25
Q16584	M3K11_HUMAN	III	S705					2.70	8.84
Q16584	M3K11_HUMAN	I/II/III	S740	-1.25	1.56	2.05	-1.29	1.69	3.29
Q16584	M3K11_HUMAN	III	T752					-1.03	4.38
Q9Y205	M3K2_HUMAN	I/II/III	S153	-1.48	.42 / 2.7	3.57	2.94	2.93	3.36
Q9Y205	M3K2_HUMAN	III	S163					1.19	1.48
Q9Y205	M3K2_HUMAN	II/III	S239			kein T	-1.06	1.53	-1.03
Q9Y205	M3K2_HUMAN	III	S331					1.33	-1.10
Q9Y205	M3K2_HUMAN	III	S147					-1.21	-1.12
Q9Y205	M3K2_HUMAN	III	S166					1.92	1.81
Q9Y205	M3K3_HUMAN	I/II/III	S176	1.13	1.77	1.37	-1.18	1.59	1.50
Q9Y205	M3K3_HUMAN	I/II	S250	-1.01	1.71	1.54	-1.20		

Uniprot	Proteinname	Studie	P-Stelle	NT003	NT002	NT004	NT007	NT011	NT008	Uniprot	Proteinname	Studie	P-Stelle	NT003	NT002	NT004	NT007	NT011	NT008
P2/448	MARK3_HUMAN	III	S563/S566					1.07	1.44	Q07002	PCTK3_HUMAN	I/III	S72					26.51	kein N
P2/448	MARK3_HUMAN	III	S566					1.50	1.18	Q07002	PCTK3_HUMAN	I/III	S87	-3.52	15.45	4.65	5.81	>12	5.63
P2/448	MARK3_HUMAN	III	S621					2.85	2.07	Q07002	PCTK3_HUMAN	I/III	S96		15.76	3.31	4.21	>2.27	1.52
P2/448	MARK3_HUMAN	III	S624					4.11	2.50	Q00764	PDXK_HUMAN	III	S261/S26				-1.60	-3.15	
P2/448	MARK3_HUMAN	II	T3			-1.64	-1.83			Q00764	PDXK_HUMAN	II	S59			-2.78	-1.72		
Q12866	MER1K_HUMAN	III	S613		-1.03			1.04	-1.38	Q00764	PDXK_HUMAN	II	S9						
P08581	MET_HUMAN	III	S966					-1.77	76.94	Q00764	PDXK_HUMAN	III	Y77				-1.94	-1.73	
P08581	MET_HUMAN	III	S988/S997					1.36	8.16	O94921	PFTK1_HUMAN	I/III	S112		1.76	1.52	1.27	3.47	-1.31
P08581	MET_HUMAN	III	S990					4.00	50.00	O94921	PFTK1_HUMAN	III	S119				2.94	-1.32	
P08581	MET_HUMAN	III	T1289					Kein N	~3	O94921	PFTK1_HUMAN	I/III	S134	-3.65	2.04	2.45	1.11	2.81	-1.55
Q96PY6	NEK1_HUMAN	I/III	S1052	1.11	4.06			2.46	1.76	O94921	PFTK1_HUMAN	I/III	S24	-1.77	1.39	3.15	1.64		
Q8TD19	NEK9_HUMAN	I/II	S331	-2.6	1.77	1.15	-1.62			O94921	PFTK1_HUMAN	III	S95					4.32	-1.39
Q8TD19	NEK9_HUMAN	I/III	S332	-2.71	1.87	1.07	-1.61	1.37	-3.38	P46019	KPB2_HUMAN	III	S1015					kein N	kein N
Q8TD19	NEK9_HUMAN	I	S332/T333	kein T	-1.37					P46019	KPB2_HUMAN	III	S1043/S1044					kein N	kein N
Q8TD19	NEK9_HUMAN	I/III	S869		1.57		-3.14	1.27	1.52	P46019	KPB2_HUMAN	III	S729					>32.66	1.96
Q8TD19	NEK9_HUMAN	III	T254		4.19			2.87	2.00	Q93100	KPB2_HUMAN	I/III	S27	2.20	14.21			>12.97	4.37
Q8TD19	NEK9_HUMAN	III	T320					1.25	1.28	Q93100	KPB2_HUMAN	I/III	S701					~9	~3
Q8TD19	NEK9_HUMAN	I/III	T333	-10.06	1.03	1.51	-2.67	-1.46	3.84	Q00443	P3C2A_HUMAN	I/II	S338	-1.53	kein T	1.53	-1.09		
Q96013	PAK4_HUMAN	I/III	S104	2.95	-1.34	1.20	-1.41	-1.22	1.47	Q16513	PKN2_HUMAN	I/III	S583	2.85	-1.17		1.04	-3.22	
Q8TD19	NEK9_HUMAN	III	T254		4.19			2.87	2.00	Q13131	AAPK1_HUMAN	I/III	S486	2.28	1.9	1.45	1.92	1.67	2.51
Q8TD19	NEK9_HUMAN	III	T320					1.25	1.28	Q13131	AAPK1_HUMAN	I/III	S486/T490			-1.10	1.08	1.24	7.95
Q8TD19	NEK9_HUMAN	I/III	T333	-10.06	1.03	1.51	-2.67	-1.46	3.84	Q13131	AAPK1_HUMAN	I/III	S496	3.02	1.3	1.71	1.28	1.20	3.53
Q96013	PAK4_HUMAN	I/III	S104	2.95	-1.34	1.20	-1.41	-1.22	1.47	Q13131	AAPK1_HUMAN	I/III	S508	2.98	1.49	1.36	1.20	1.53	1.64
Q96013	PAK4_HUMAN	III	S142					-1.24	2.74	Q13131	AAPK1_HUMAN	III	T382					-2.55	11.15
Q96013	PAK4_HUMAN	I/III	S148	1.48	-1.07	2.42	1.21	1.21	3.00	Q13131	AAPK1_HUMAN	I/III	T482/T490			-1.03	1.21	1.22	8.33
Q96013	PAK4_HUMAN	I/III	S167	5.68	1.22	1.82	-1.04			Q13131	AAPK1_HUMAN	I/III	T490	6.02	1.17	-1.03	1.21	2.19	4.98
Q96013	PAK4_HUMAN	I/III	S181		1.48	1.73	2.00	1.64	4.18	P54646	AAPK2_HUMAN	I/III	S377	-3.68	-1.78	-1.23	-7.04	-1.67	-2.12
Q96013	PAK4_HUMAN	III	S41					1.82	2.18	P54646	AAPK2_HUMAN	II	S491			1.59	1.26		
Q96013	PAK4_HUMAN	III	S443					-1.17	1.14	P54646	AAPK2_HUMAN	III	S501					kein N	
Q96013	PAK4_HUMAN	I/III	S474	-1.06	-1.06	-1.04	-1.06	-1.37	-1.07	Q9Y478	AAKB1_HUMAN	III	S101					1.51	-7.38
Q96013	PAK4_HUMAN	III	T207					1.30	4.28	Q9Y478	AAKB1_HUMAN	I/III	S108			kein T	kein N	1.41	-2.65
Q00536	PCTK1_HUMAN	I/III	S110			1.57	1.22	3.32	1.77	Q9Y478	AAKB1_HUMAN	III	S180				2.47	mix	
Q00536	PCTK1_HUMAN	I/III	S12	-1.15	-1.41	1.08	-1.13	1.04	5.73	Q9Y478	AAKB1_HUMAN	II	S24			3.69	2.50		
Q00536	PCTK1_HUMAN	I/III	S138				kein T	2.54	3.48	Q9Y478	AAKB1_HUMAN	III	S40					2.06	1.50
Q00536	PCTK1_HUMAN	I/III	S153		1.93	1.82	1.31	2.42	2.78	Q9Y478	AAKB1_HUMAN	I/III	S96			-1.80	-2.04	1.38	-2.84
Q00536	PCTK1_HUMAN	III	S155					-4.09	2.60	Q9Y478	AAKB1_HUMAN	II	T28			4.33	3.19		
Q00536	PCTK1_HUMAN	I/III	S65			-2.43	-1.93	1.23	1.57	Q43741	AAKB2_HUMAN	I/III	S108			kein T	kein T	1.47	-3.38
Q00536	PCTK1_HUMAN	III	S78					-1.14	2.45	Q43741	AAKB2_HUMAN	III	S158				1.02	-3.12	
Q00536	PCTK1_HUMAN	III	S78S95					2.29	kein N	Q43741	AAKB2_HUMAN	III	S173/S17				1.80	-1.38	
Q00536	PCTK1_HUMAN	III	S95					2.43	2.85	Q43741	AAKB2_HUMAN	I/III	S183/S184	4.67	2.19	1.75	1.55	2.78	1.31
Q00537	PCTK2_HUMAN	III	S122					kein N	mix	Q43741	AAKB2_HUMAN	I/III	S21			1.56	1.86	-1.71	-1.32
Q00537	PCTK2_HUMAN	I/III	S137		2.83	1.92	1.56	3.27	1.04	Q43741	AAKB2_HUMAN	III	S39		3.77			5.54	2.01
Q00537	PCTK2_HUMAN	I/III	S165	~2	4.26	2.30	1.76	4.31	2.13	Q43741	AAKB2_HUMAN	III	Y39					1.28	-2.70
Q00537	PCTK2_HUMAN	I/III	S180		4.50	2.21	1.59	3.14	1.50	P54619	AAKG1_HUMAN	III	S47					1.53	1.24
Q00537	PCTK2_HUMAN	II	S9		1.85	2.22	1.42			Q9UGJ0	AAKG2_HUMAN	I/III	S101			5.23	1.18	9.65	1.66
Q07002	PCTK3_HUMAN	I/III	S115			non	2.57	>15.02	5.72	Q9UGJ0	AAKG2_HUMAN	III	S113					3.49	-1.98
Q07002	PCTK3_HUMAN	I/III	S12	-8.90	9.93	5.49	3.58	7.43	7.63	Q9UGJ0	AAKG2_HUMAN	I/III	S196	-2.50	2.24	1.85	-1.03	3.28	1.52
Q07002	PCTK3_HUMAN	I/III	S130	~4.5	>10.16	5.42	3.86	>4.08	2.07	Q05655	KPCD_HUMAN	II/III	S645			-1.91	1.02		
Q07002	PCTK3_HUMAN	I	S14	-5.8	4.38					Q05655	KPCD_HUMAN	III	S664					-1.08	-1.93

Uniprot	Proteinname	Studie	P-Stelle	NT003	NT002	NT004	NT007	NT011	NT008
Q05655	KPCD1_HUMAN	III	S506/T507					1.20	
Q04759	KPCD1_HUMAN	II	S676		-1.63	-4.71		1.13	
Q04759	KPCD1_HUMAN	II/III	S695		1.23	-2.16		-2.40	-1.00
Q04759	KPCD1_HUMAN	III	T538					-6.00	-1.90
Q15139	KPCD1_HUMAN	II/III	S205		1.01	-1.48		2.67	-1.03
Q15139	KPCD1_HUMAN	II/III	S205/S208		-1.03	-1.10		1.66	-1.69
Q04759	KPCD1_HUMAN	II/III	S695		1.23	-2.16		-2.40	-1.00
Q04759	KPCD1_HUMAN	III	T538					-6.00	-1.90
Q15139	KPCD1_HUMAN	II/III	S205		1.01	-1.48		2.67	-1.03
Q15139	KPCD1_HUMAN	II/III	S205/S208		-1.03	-1.10		1.66	-1.69
Q15139	KPCD1_HUMAN	III	S208					-1.02	
Q15139	KPCD1_HUMAN	II/III	S219/S223	-1.2	-2.9	-2.17		-1.44	-3.64
Q15139	KPCD1_HUMAN	II/III	S235	-2.23	-1.25			1.16	-1.19
Q15139	KPCD1_HUMAN	II/III	S237	-1.52	-1.7	-1.68		1.17	1.03
Q15139	KPCD1_HUMAN	II/III	S249/S251			-1.28		4.95	-1.29
Q15139	KPCD1_HUMAN	II/III	S421		-1.67	-2.57		1.11	-4.09
Q15139	KPCD1_HUMAN	III	S473					1.10	kein T
Q15139	KPCD1_HUMAN	II/III	S548/S54	kein N	-2.58	-2.20		1.10	-2.31
Q9BZL6	KPCD2_HUMAN	II/III	S197		2.08	-1.11		2.35	1.23
Q9BZL6	KPCD2_HUMAN	II/III	S197T199/S197S200		1.60	kein T		1.08	1.82
Q9BZL6	KPCD2_HUMAN	III	S214					1.09	-1.12
Q9BZL6	KPCD2_HUMAN	II/III	S225	-1.55	1.08			-1.43	-1.00
Q9BZL6	KPCD2_HUMAN	III	S375					1.11	1.29
Q9BZL6	KPCD2_HUMAN	I	S395/S396	-1.59	2.32			-1.12	1.07
Q94806	KPCD3_HUMAN	III	S30/S31					-1.07	1.76
Q94806	KPCD3_HUMAN	II/III	S364	-1.92	2.07			1.24	1.94
Q94806	KPCD3_HUMAN	III	S415					1.10	1.56
Q94806	KPCD3_HUMAN	III	T535					1.87	1.59
Q05397	FAK1_HUMAN	III	S390					2.53	1.17
Q05397	FAK1_HUMAN	III	S574		1.06			1.62	1.24
Q05397	FAK1_HUMAN	II/III	S910	-3.12	-1.14	-2.78		2.23	5.45
Q05397	FAK1_HUMAN	III	T575					2.03	1.21
Q05397	FAK1_HUMAN	III	Y397					2.14	kein N
Q05397	FAK1_HUMAN	II/III	Y570	1.43	-1.18	1.35		-1.03	-1.05
Q05397	FAK1_HUMAN	II/III	Y576	-1.59	1.03	-1.72		2.17	1.03
Q05397	FAK1_HUMAN	III	Y925		-1.68	-2.89		1.64	1.03
Q14289	FAK2_HUMAN	III	S375					2.92	-2.50
Q9BVS4	RIK2_HUMAN	II/III	S337					1.28	-1.04
Q9BVS4	RIK2_HUMAN	II/III	S350		2.17	3.07		1.88	2.38
Q43353	RIPK2_HUMAN	II/III	S178	1.05	3.15	4.67		-4.80	6.69
Q43353	RIPK2_HUMAN	II/III	S363	2.90	2.15	1.82		1.39	13.97
Q43353	RIPK2_HUMAN	III	S527	1.03	1.93/2.8	2.38		1.55	14.99
Q43353	RIPK2_HUMAN	III	S529					1.59	6.83
Q43353	RIPK2_HUMAN	III	S531					1.27	3.94
Q13464	ROCK1_HUMAN	III	T1189	1.1	2	2.10		2.20	5.73
Q13464	ROCK1_HUMAN	III	T1341					-2.24	1.13
Q13464	ROCK1_HUMAN	I	T632	-1.18	1.14			1.47	-1.35
Q13464	ROCK1_HUMAN	I	T632						
Q15418	KS6A1_HUMAN	III	S363						
Q15418	KS6A1_HUMAN	III	S380						
Q15418	KS6A1_HUMAN	II	T359/S363		1.12				
Q15418	KS6A1_HUMAN	III	S346						
Q151812	KS6A3_HUMAN	II/III	S369						
Q151812	KS6A3_HUMAN	III	S386						
Q151812	KS6A3_HUMAN	II/III	S415	1.06	1.55	1.82		1.96	1.75
Q151812	KS6A3_HUMAN	II/III	S715	1.04	1.23	2.22		1.59	2.84
Q151812	KS6A3_HUMAN	II	T736		3.25	-1.12			
Q9H0K1	SNIL2_HUMAN	II/III	S343	-1.61	2.01	1.25			
Q9H0K1	SNIL2_HUMAN	III	S358/S359					-1.06	1.63
Q9H0K1	SNIL2_HUMAN	III	S576					1.74	1.85
Q9H0K1	SNIL2_HUMAN	III	S587					2.14	1.53
Q9H2G2	SLK_HUMAN	III	S189					mix	kein T
Q9H2G2	SLK_HUMAN	III	S372					1.27	-1.54
Q12931	SRC_HUMAN	II/III	S104	3.81	1.88	-1.13		-1.16	2.90
Q12931	SRC_HUMAN	II/III	S17	2.02	2.02	kein N		1.76	6.41
Q12931	SRC_HUMAN	III	S51					1.55	3.56
Q12931	SRC_HUMAN	II/III	S69		-2.77	-4.13		1.08	1.26
Q12931	SRC_HUMAN	III	S75					-1.04	6.39
Q15831	STK11_HUMAN	II/III	S31	1.4	1.22	-1.11		2.05	1.49
Q15831	STK11_HUMAN	II	S31/S32		1.03	1.06			
Q13188	STK3_HUMAN	II/III	S316	8.89	1.28	-1.31		1.42	-1.00
Q13188	STK3_HUMAN	III	T336					1.49	18.08
Q13043	STK4_HUMAN	II/III	S20	2.25	4.08			2.14	2.89
Q13043	STK4_HUMAN	III	S414					1.55	3.41
Q43405	KSYK_HUMAN	III	Y323					4.09	2.45
Q7L7X3	TAOK1_HUMAN	III	S417					2.00	2.44
Q7L7X3	TAOK1_HUMAN	II/III	S421	-1.5	2.59	1.03		-1.04	4.96
Q7L7X3	TAOK1_HUMAN	III	S426					-1.29	3.78
Q7L7X3	TAOK1_HUMAN	II/III	S445	1.04	-1.57	-1.20		-1.35	4.59
Q7L7X3	TAOK1_HUMAN	III	S9					-1.64	-2.14
Q7L7X3	TAOK1_HUMAN	II/III	S965	-1.12	1.25	1.40		-1.19	
Q9UL54	TAOK2_HUMAN	II/III	S473	1.03		-1.14		-1.39	
Q9UL54	TAOK2_HUMAN	III	S486		1.20				
Q9UL54	TAOK2_HUMAN	II/III	S324		kein N				
Q9H2K8	TAOK3_HUMAN	II/III	S442	2.05	1.32	1.69		-1.06	
Q9H2K8	TAOK3_HUMAN	II	S172					-1.40	-3.05
Q9UHD2	TBK1_HUMAN	III	S409					1.07	-1.50
Q37173	TGFR2_HUMAN	III	S548					1.01	12.16
Q9UKES	TNIK_HUMAN	III	S570					2.56	7.64
Q9UKES	TNIK_HUMAN	II/III	S640	4.11	1.7	1.97		3.66	5.05
Q9UKES	TNIK_HUMAN	II/III	S680	2.60	1.21	1.92		2.59	1.99
Q9UKES	TNIK_HUMAN	III	S766/S769					1.79	1.48
Q9UKES	TNIK_HUMAN	II	S810					2.97	1.89
Q07912	ACK1_HUMAN	II	T8	-1.14	1.07	1.08		kein N	-1.69
Q96844	PRPK_HUMAN	II/III	T8	2.88	-1.54	-1.09		-1.33	
Q96844	PRPK_HUMAN	II/III	T8						
Q9NYL2	MLTK_HUMAN	III	S593					kein N	
Q9NYL2	MLTK_HUMAN	III	S633					1.14	5.24
Q9NYL2	MLTK_HUMAN	I	S636/S637	kein N	1.58				



Tab. 7-4: Entsprechend der Phosphosite.org Datenbank erstmalig annotierte Phosphorylierung				
Uniprot	Proteinname	Studien	Peptidsequenz	P-Stelle
Q9P0L2	MARK1_HUMAN	I / II	SIS~ANQK	S414
P27448	MARK3_HUMAN	I / II	SVS~SSQK	S2
Q9H0K1	SN1L2_HUMAN	I / II	SS~FPVEQR	S343
Q9Y6M4	KC1G3_HUMAN	I / III	GTGS~SSSGVLMVGPNFR	S310
P49841	GSK3B_HUMAN	I / III	GQTNNAASASASNS~T,	S419/ S420
Q99683	M3K5_HUMAN	I / III	GS~SVGGGSR,	S83
Q99683	M3K5_HUMAN	I / III	LSALSAGS~NEYLR	S958
Q9BZL6	KPCD2_HUMAN	I / III	S~TTELLPR	S225
Q9Y5S2	MRCKB_HUMAN	II / III	ALSNS~NRDK	S481
O94921	PFTK1_HUMAN	II / III	TSSTGKES~PK	S112
O43741	AAKB2_HUMAN	II / III	S~EGAGGHAPGK	S21
Q9UGJ0	AAKG2_HUMAN	II / III	TSPGS~PK	S101
Q13554	KCC2B_HUMAN	I / II / III	NSAAATS~PK	S367
Q13555	KCC2G_HUMAN	I / II / III	GS~TESCNTTTTEDEDLK	S381
Q13555	KCC2G_HUMAN	I / II / III	GST~ESCNTTTTEDEDLK	T382
P12931	SRC_HUMAN	I / II / III	TETDLS~FK	S104

## 7.3 VERZEICHNIS: TABELLEN UND ABBILDUNGEN

### Tabellen

Tab. 1-1: Eingruppierung der Stadien mittels TNM-Klassifikation .....	10
Tab. 3-1: Allgemeine Chemikalien und Reagenzien .....	26
Tab. 3-2: Zusammensetzung für Trenn- und Sammelgel .....	28
Tab. 3-3: Lösungen der eindimensionalen SDS-Proteingelelektrophorese .....	28
Tab. 3-4: Zusammensetzung der Färbelösung und anderer benötigter Komponenten .....	29
Tab. 3-5: Verwendete Puffer für die Western Blot-Analyse .....	30
Tab. 3-6: Liste verwendeter primärer Antikörper .....	30
Tab. 3-7: Liste verwendeter sekundärer Antikörper .....	31
Tab. 3-8: Zusammensetzung der verwendeten Puffer für Immunodektion .....	31
Tab. 3-9: Verwendete Puffer zur Antikörper-Desorption .....	32
Tab. 3-10: Charakterisierung der Tumorproben .....	33
Tab. 3-11: Für die Aufbereitung humaner Gewebeproben benötigte Puffer .....	34
Tab. 3-12: Verwendete Säulen und Proteinmengen .....	35
Tab. 3-13: Benötigte Puffer für die Kinase-selektive Affinitätschromatographie .....	36
Tab. 3-14: Ansatz zur Wessel-Flügge Fällung .....	37
Tab. 3-15: Mengen für iTRAQ Ansätze .....	38
Tab. 3-16: Verwendete Puffer zur Peptidaufreinigung .....	39
Tab. 3-17: Für die Aufreinigung phosphorylierter Peptide benötigte Puffer .....	40
Tab. 3-18: Verwendete Puffer für die Kationenaustausch-Chromatographie .....	41
Tab. 3-19: Verwendete Puffer zur Peptidtrennung in der nano-UPLC .....	42
Tab. 3-20: Spezifische MS- und MS/MS-Einstellungen bezüglich der Dynamischer Ausgrenzung („Dynamic exclusion“) .....	42
Tab. 3-21: Parameter zur Peptid-/Protein-Identifizierung .....	43
Tab. 4-1: Pathologische Charakterisierung der für die Experimente ausgewählten Proben .....	52
Tab. 4-2: Verwendete Gewebemenge und extrahierten Gesamtproteinmenge .....	53
Tab. 4-3: Duplex- und 4plex-Markierung der Proben 002 und 003 .....	64
Tab. 4-4: Probenarrangement zur Erstellung der RCC Phospho-Kinom-Regulationsprofile .....	66
Tab. 4-5: Regulierte Kinasen mit Kategorie, Kennzeichen und Vorkommen. ....	73
Tab. 4-6: Regulierte Phosphorylierungen an Kinasen .....	77
Tab. 7-1: Daten zur Identifizierung und Zuordnung von Kinasen .....	109
Tab. 7-1: Daten zur Identifizierung und Zuordnung von Kinasen .....	109
Tab. 7-2: Daten der quantitativen Analyse mit [log2]RF .....	113
Tab. 7-3: Phosphorylierungsstellen und Regulationsfaktoren .....	113
Tab. 7-4: In der Phosphosite.org Datenbank erstmalig annotierte Phosphorylierungen .....	113

## Abbildungen:

Abb. 1-1: Krebsneuerkrankungen und Todesfälle .....	8
Abb. 1-2: Die häufigsten histologisch differenzierten Nierenzellkarzinomtypen .....	10
Abb. 1-3: 5-Jahresüberlebensrate bei Krebserkrankungen .....	12
Abb. 1-4: Mechanismen der Bindung klinisch-relevanter Kinaseinhibitoren .....	13
Abb. 1-5: Signaltransduktion mit Fokus auf Phosphorylierungen.....	14
Abb. 1-6: Das humane Kinom und Phosphorylierungen .....	16
Abb. 1-7: Bekannte im RCC-involvierte Signalwege.....	18
Abb. 1-8: Phosphopeptidanreicherung .....	21
Abb. 1-9: Die Quantifizierungsstrategien SILAC, ICAT und iTRAQ .....	24
Abb. 4-1: Experimentelles Design zur quantitativen Analyse von Proteinkinasen und Phosphorylierungen aus ex-vivo Gewebe .....	49
Abb. 4-2: Aufnahmen vom Nierenzellkarzinom .....	50
Abb. 4-3: Makroskopische Veränderung der Gewebelysate. ....	54
Abb. 4-4: Gesamtzelllysat aller analysierten Gewebeproben .....	54
Abb. 4-5: Messung der Proteinmenge der kinase-angereicherten Fraktionen .....	56
Abb. 4-6: Anreicherungs-effizienz der kinase-selektiven Affinitätschromatographie.....	57
Abb. 4-7: Einordnung der identifizierten Kinasen.....	58
Abb. 4-8: Mittlerer Proteinscore der verschiedenen Kinasegruppen.....	59
Abb. 4-9: Fragmentionen-Spektrum. ....	59
Abb. 4-10: Fragmentionen-Spektrum des phosphorylierten und korrespondierenden nicht- phosphorylierten Peptides ASLSDIGFGK vom Protein PCTK3 .....	61
Abb. 4-11: Das Phospho-Kinom in dem RCC.....	62
Abb. 4-12: Menge detektierter Phosphorylierungen.....	63
Abb. 4-13: Korrelationsanalysen der zwei Markierungsverfahren .....	65
Abb. 4-14: Geringe Varianz der Kinase-Regulationsprofile der gesunden Nierenparenchyme. ....	67
Abb. 4-15: Clusteranalyse der erstellten RCC-Kinase-Regulationsprofile. ....	68
Abb. 4-16: Graphische Darstellung der signifikant regulierten Kinase CDK2 und M4K4 .....	70
Abb. 4-17: Regulierte Kinasen. ....	71
Abb. 4-18: Quantifizierung der Fragmentionen-Spektren mit iTRAQ.....	72
Abb. 4-19: Western-Blot-Analyse mit sechs ausgewählten Kinasen .....	74
Abb. 4-20: Immunohistochemische Färbung des chromophoben Tumors mit CD117. ....	75
Abb. 4-21: Massenspektrometrische Quantifizierung der Phosphorylierung von MK01/ GSK3B..	77
Abb. 4-22: Western Blot Analyse von ERK1/2.....	79
Abb. 4-23: Peptidabdeckung der regulierten und phosphorylierten Kinase PCTK3. ....	80
Abb. 4-24: Massenspektrometrische Quantifizierung der Kinase PCTK3 .....	81
Abb. 4-25: Regulatorische Information zur identifizierten Phosphorylase b Kinase .....	82

Abb. 4-26: Stadien-spezifische Betrachtung der Regulierungen bei Phosphorylierungen .....	83
Abb. 4-27: Stadien-spezifische Betrachtung der Regulierungen bei Kinasen. ....	84
Abb. 4-28: Ein abweichend reguliertes Peptid der Kinase CSK21 in den Tumorproben. ....	85
Abb. 5-1: Einfluss zellulärer Faktoren auf das Bindungsverhalten der Kinasen an ATP-kompetitive Inhibitoren.....	89
Abb. 5-2: Zuordnung der identifizierten Kinasen zu bekannten Signalwegen .....	98
Abb. 5-3: mTOR-Signalweg und die aerobe Glykolyse. ....	100
Abb. 5-4: Veränderungen der Zellphysiologien. ....	102

## 7.4 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G.R. Bignell, C.D. Greenman, H. Davies, A.P. Butler, S. Edkins, J.M. Andrews, G. Buck, L. Chen, D. Beare, C. Latimer, S. Widaa, J. Hinton, C. Fahey, B. Fu, S. Swamy, G.L. Dalgliesh, B.T. Teh, P. Deloukas, F. Yang, P.J. Campbell, P.A. Futreal, and M.R. Stratton, "Signatures of mutation and selection in the cancer genome.," *Nature*, vol. 463, Feb. 2010, pp. 893-8.
- [2] M.R. Stratton, P.J. Campbell, and P.A. Futreal, "The cancer genome.," *Nature*, vol. 458, Apr. 2009, pp. 719-24.
- [3] D. Hanahan and R.A. Weinberg, "The hallmarks of cancer.," *Cell*, vol. 100, Jan. 2000, pp. 57-70.
- [4] A. Jemal, R. Siegel, J. Xu, and E. Ward, "Cancer statistics, 2010.," *CA: a cancer journal for clinicians*, vol. 60, Jul. 2010, pp. 277-300.
- [5] P. Lindblad, "Epidemiology of renal cell carcinoma.," *Scandinavian journal of surgery : SJS : official organ for the Finnish Surgical Society and the Scandinavian Surgical Society*, vol. 93, Jan. 2004, pp. 88-96.
- [6] B. Ljungberg, N.C. Cowan, D.C. Hanbury, M. Hora, M. a Kuczyk, A.S. Merseburger, J.-J. Patard, P.F. a Mulders, and I.C. Sinescu, "EAU guidelines on renal cell carcinoma: the 2010 update.," *European urology*, vol. 58, Sep. 2010, pp. 398-406.
- [7] A. Bergström, C.C. Hsieh, P. Lindblad, C.M. Lu, N.R. Cook, and A. Wolk, "Obesity and renal cell cancer--a quantitative review.," *British journal of cancer*, vol. 85, Sep. 2001, pp. 984-90.
- [8] J.M. Yuan, J.E. Castela, M. Gago-Dominguez, M.C. Yu, and R.K. Ross, "Tobacco use in relation to renal cell carcinoma.," *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, vol. 7, May. 1998, pp. 429-33.
- [9] C.S. Ng, C.G. Wood, P.M. Silverman, N.M. Tannir, P. Tamboli, and C.M. Sandler, "Renal cell carcinoma: diagnosis, staging, and surveillance.," *AJR. American journal of roentgenology*, vol. 191, Oct. 2008, pp. 1220-32.
- [10] K.H. Tsui, O. Shvarts, R.B. Smith, R. Figlin, J.B. de Kernion, and A. Belldegrun, "Renal cell carcinoma: prognostic significance of incidentally detected tumors.," *The Journal of urology*, vol. 163, Feb. 2000, pp. 426-30.
- [11] P. Guinan, L.H. Sobin, F. Algaba, F. Badellino, S. Kameyama, G. MacLennan, and A. Novick, "TNM staging of renal cell carcinoma: Workgroup No. 3. Union International Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC).," *Cancer*, vol. 80, Sep. 1997, pp. 992-3.
- [12] L.H. Sobin, M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM Classification of Malignant Tumours*, Oxford: Wiley-Blackwell, 2009.
- [13] S.A. Fuhrman, L.C. Lasky, and C. Limas, "Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma.," *The American journal of surgical pathology*, vol. 6, Oct. 1982, pp. 655-63.
- [14] J.N. Eble, J.I. Epstein, and I.A. Sesterhenn, "World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs Edited by," 2004.
- [15] R.C. Flanigan, G. Mickisch, R. Sylvester, C. Tangen, H. Van Poppel, and E.D. Crawford, "Cytoreductive nephrectomy in patients with metastatic renal cancer: a combined analysis.," *The Journal of urology*, vol. 171, Mar. 2004, pp. 1071-6.

- [16] K. Nishiyama, T. Shirahama, A. Yoshimura, T. Sumizawa, T. Furukawa, M. Ichikawa-Haraguchi, S. Akiyama, and Y. Ohi, "Expression of the multidrug transporter, P-glycoprotein, in renal and transitional cell carcinomas.," *Cancer*, vol. 71, Jun. 1993, pp. 3611-9.
- [17] C.J. Matheny, M.W. Lamb, K.R. Brouwer, and G.M. Pollack, "Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation.," *Pharmacotherapy*, vol. 21, Jul. 2001, pp. 778-96.
- [18] W.T. Bellamy, "P-glycoproteins and multidrug resistance.," *Annual review of pharmacology and toxicology*, vol. 36, Jan. 1996, pp. 161-83.
- [19] C.K. Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ and B. Edwards (eds), "SEER Cancer Statistics Review 1975-2008."
- [20] K.A. Furge, J.P. MacKeigan, and B.T. Teh, "Kinase targets in renal-cell carcinomas: reassessing the old and discovering the new.," *The lancet oncology*, vol. 11, Jun. 2010, pp. 571-8.
- [21] M.A. Somerville, "A postmodern moral tale: the ethics of research relationships.," *Nature reviews. Drug discovery*, vol. 1, Apr. 2002, pp. 316-20.
- [22] J. Zhang, P.L. Yang, and N.S. Gray, "Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors.," *Nature reviews. Cancer*, vol. 9, Jan. 2009, pp. 28-39.
- [23] G.J. Weiner, "Monoclonal antibody mechanisms of action in cancer.," *Immunologic research*, vol. 39, Jan. 2007, pp. 271-8.
- [24] European Medicines Agency, *Nexavar; INN: Sorafenib*, 2009.
- [25] European Medicines Agency, *Sutent*, 2010.
- [26] R.J. Motzer, T.E. Hutson, P. Tomczak, M.D. Michaelson, R.M. Bukowski, O. Rixe, S. Oudard, S. Negrier, C. Szczylik, S.T. Kim, I. Chen, P.W. Bycott, C.M. Baum, and R.A. Figlin, "Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma.," *The New England journal of medicine*, vol. 356, Jan. 2007, pp. 115-24.
- [27] B. Escudier, T. Eisen, W.M. Stadler, C. Szczylik, S. Oudard, M. Siebels, S. Negrier, C. Chevreau, E. Solska, A. a Desai, F. Rolland, T. Demkow, T.E. Hutson, M. Gore, S. Freeman, B. Schwartz, M. Shan, R. Simantov, and R.M. Bukowski, "Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma.," *The New England journal of medicine*, vol. 356, Jan. 2007, pp. 125-34.
- [28] C.N. Sternberg, I.D. Davis, J. Mardiak, C. Szczylik, E. Lee, J. Wagstaff, C.H. Barrios, P. Salman, O. a Gladkov, A. Kavina, J.J. Zarbá, M. Chen, L. McCann, L. Pandite, D.F. Roychowdhury, and R.E. Hawkins, "Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial.," *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 28, Feb. 2010, pp. 1061-8.
- [29] European Medicines Agency, *Afinitor*, 2009.
- [30] T. Mikalsen, N. Gerits, and U. Moens, "Inhibitors of signal transduction protein kinases as targets for cancer therapy.," *Biotechnology annual review*, vol. 12, Jan. 2006, pp. 153-223.
- [31] Y. Liu and N.S. Gray, "Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations.," *Nature chemical biology*, vol. 2, Jul. 2006, pp. 358-64.
- [32] L.M. Ballou and R.Z. Lin, "Rapamycin and mTOR kinase inhibitors.," *Journal of chemical biology*, vol. 1, Nov. 2008, pp. 27-36.
- [33] M. a Lemmon and J. Schlessinger, "Cell signaling by receptor tyrosine kinases.," *Cell*, vol. 141, Jun. 2010, pp. 1117-34.

- [34] C.T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, and G.J. Gatto, "Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications.," *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, vol. 44, Dec. 2005, pp. 7342-72.
- [35] P. Blume-Jensen and T. Hunter, "Oncogenic kinase signalling.," *Nature*, vol. 411, May. 2001, pp. 355-65.
- [36] G. Manning, D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, and S. Sudarsanam, "The protein kinase complement of the human genome.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 298, Dec. 2002, pp. 1912-34.
- [37] M. Mann, S.E. Ong, M. Grønborg, H. Steen, O.N. Jensen, and A. Pandey, "Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome.," *Trends in biotechnology*, vol. 20, Jun. 2002, pp. 261-8.
- [38] J.V. Olsen, B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen, and M. Mann, "Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks.," *Cell*, vol. 127, Nov. 2006, pp. 635-48.
- [39] M.B. Yaffe and a E. Elia, "Phosphoserine/threonine-binding domains.," *Current opinion in cell biology*, vol. 13, Apr. 2001, pp. 131-8.
- [40] B.T. Seet, I. Dikic, M.-M. Zhou, and T. Pawson, "Reading protein modifications with interaction domains.," *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 7, Jul. 2006, pp. 473-83.
- [41] H. Brauch, G. Weirich, J. Brieger, D. Glavac, H. Rödl, M. Eichinger, M. Feurer, E. Weidt, C. Puranakanittha, C. Neuhaus, S. Pomer, W. Brenner, P. Schirmacher, S. Störkel, M. Rotter, A. Masera, N. Gugeler, and H.J. Decker, "VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation.," *Cancer research*, vol. 60, Apr. 2000, pp. 1942-8.
- [42] J.R. Gnarra, K. Tory, Y. Weng, L. Schmidt, M.H. Wei, H. Li, F. Latif, S. Liu, F. Chen, and F.M. Duh, "Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma.," *Nature genetics*, vol. 7, May. 1994, pp. 85-90.
- [43] K. Foster, A. Prowse, A. van den Berg, S. Fleming, M.M.F. Hulsbeek, P.A. Crossey, F.M. Richards, P. Cairns, N.A. Affara, and M.A. Ferguson-Smith, "Somatic mutations of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma.," *Human molecular genetics*, vol. 3, Dec. 1994, pp. 2169-73.
- [44] J.D. Gordan and M.C. Simon, "Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype.," *Current opinion in genetics & development*, vol. 17, Feb. 2007, pp. 71-7.
- [45] P.H. Patel, R.S.V. Chadalavada, R.S.K. Chaganti, and R.J. Motzer, "Targeting von Hippel-Lindau pathway in renal cell carcinoma.," *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 12, Dec. 2006, pp. 7215-20.
- [46] G. Banumathy and P. Cairns, "Signaling pathways in renal cell carcinoma.," *Cancer biology & therapy*, vol. 10, Oct. 2010, pp. 658-64.
- [47] V.H. Haase, "The VHL/HIF oxygen-sensing pathway and its relevance to kidney disease.," *Kidney international*, vol. 69, Apr. 2006, pp. 1302-7.
- [48] K.-K. Wong, "Recent developments in anti-cancer agents targeting the Ras/Raf/ MEK/ERK pathway.," *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, vol. 4, Jan. 2009, pp. 28-35.
- [49] A.A. Adjei, "Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy.," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 93, Jul. 2001, pp. 1062-74.
- [50] R.A. Hilger, M.E. Scheulen, and D. Strumberg, "The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer.," *Onkologie*, vol. 25, Dec. 2002, pp. 511-8.

- [51] R.M. Bukowski and W.P. Bro, "Underlying Pathophysiology of Renal Cell Carcinoma: An Essential Primer on Etiology, Tumor Cell Growth and Therapeutic Targets," *Cancer*, vol. 2, 2004, pp. 10-16.
- [52] C. Peyssonnaud and A. Eychène, "The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation.," *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, vol. 93, Sep. 2001, pp. 53-62.
- [53] H. Oka, Y. Chatani, R. Hoshino, O. Ogawa, Y. Kakehi, T. Terachi, Y. Okada, M. Kawaichi, M. Kohno, and O. Yoshida, "Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma.," *Cancer research*, vol. 55, Sep. 1995, pp. 4182-7.
- [54] H.J. Lee, D.-I. Kim, G.H. Kang, C. Kwak, J.H. Ku, and K.C. Moon, "Phosphorylation of ERK1/2 and prognosis of clear cell renal cell carcinoma.," *Urology*, vol. 73, Feb. 2009, pp. 394-9.
- [55] S. Wullschleger, R. Loewith, and M.N. Hall, "TOR signaling in growth and metabolism.," *Cell*, vol. 124, Feb. 2006, pp. 471-84.
- [56] R.A. Figlin, P. de Souza, D. McDermott, J.P. Dutcher, A. Berkenblit, A. Thiele, M. Krygowski, A. Strahs, J. Feingold, J. Boni, and G. Hudes, "Analysis of PTEN and HIF-1alpha and correlation with efficacy in patients with advanced renal cell carcinoma treated with temsirolimus versus interferon-alpha.," *Cancer*, vol. 115, Aug. 2009, pp. 3651-60.
- [57] N. Hay and N. Sonenberg, "Upstream and downstream of mTOR.," *Genes & development*, vol. 18, Aug. 2004, pp. 1926-45.
- [58] G.R. Hudes, "Targeting mTOR in renal cell carcinoma.," *Cancer*, vol. 115, May. 2009, pp. 2313-20.
- [59] W. Brenner, G. Färber, T. Herget, H.-A. Lehr, J.G. Hengstler, and J.W. Thüroff, "Loss of tumor suppressor protein PTEN during renal carcinogenesis.," *International journal of cancer. Journal international du cancer*, vol. 99, May. 2002, pp. 53-7.
- [60] W.W. Ma and A. a Adjei, "Novel agents on the horizon for cancer therapy.," *CA: a cancer journal for clinicians*, vol. 59, 2009, pp. 111-37.
- [61] J. Sosman and I. Puzanov, "Combination targeted therapy in advanced renal cell carcinoma.," *Cancer*, vol. 115, May. 2009, pp. 2368-75.
- [62] R. Beroukhi, C.H. Mermel, D. Porter, G. Wei, and S. Raychaudhuri, "The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers.," *Nature*, vol. 463, Feb. 2010, pp. 899-905.
- [63] I.V. Cheburkin, T.G. Kniazeva, S. Peter, I.P. Kniazev, M.I. Karelin, M.I. Shkol'nik, V.I. Evtushenko, K.P. Hanson, A. Ullrich, and P.G. Kniazev, "[Molecular portrait of human kidney carcinomas: the gene expression profiling of protein-tyrosine kinases and tyrosine phosphatases which controlled regulatory signals in the cells].," *Molekuliarnaia biologii*, vol. 36, 2002, pp. 480-90.
- [64] S. Kilpinen, K. Ojala, and O. Kallioniemi, "Analysis of kinase gene expression patterns across 5681 human tissue samples reveals functional genomic taxonomy of the kinome.," *PLoS one*, vol. 5, Jan. 2010, p. e15068.
- [65] B. Macek, M. Mann, and J.V. Olsen, "Global and site-specific quantitative phosphoproteomics: principles and applications.," *Annual review of pharmacology and toxicology*, vol. 49, Jan. 2009, pp. 199-221.
- [66] W. Kolch and A. Pitt, "Functional proteomics to dissect tyrosine kinase signalling pathways in cancer.," *Nature reviews. Cancer*, vol. 10, Sep. 2010, pp. 618-29.
- [67] H. Steen, J.A. Jebanathirajah, J. Rush, N. Morrice, and M.W. Kirschner, "Phosphorylation analysis by mass spectrometry: myths, facts, and the consequences for qualitative and



- quantitative measurements.,” *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 5, Jan. 2006, pp. 172-81.
- [68] L. Andersson and J. Porath, “Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe<sup>3+</sup>) affinity chromatography.,” *Analytical biochemistry*, vol. 154, Apr. 1986, pp. 250-4.
- [69] M.C. Posewitz and P. Tempst, “Immobilized gallium(III) affinity chromatography of phosphopeptides.,” *Analytical chemistry*, vol. 71, Jul. 1999, pp. 2883-92.
- [70] S.B. Ficarro, M.L. McClelland, P.T. Stukenberg, D.J. Burke, M.M. Ross, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, and F.M. White, “Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*.,” *Nature biotechnology*, vol. 20, Mar. 2002, pp. 301-5.
- [71] Y. Ikeguchi and H. Nakamura, “Determination of organic phosphates by column-switching high performance anion-exchange chromatography using on-line preconcentration on titania,” *Analytical sciences*, vol. 13, 1997, p. 479–483.
- [72] M.W.H. Pinkse, P.M. Uitto, M.J. Hilhorst, B. Ooms, and A.J.R. Heck, “Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns.,” *Analytical chemistry*, vol. 76, Jul. 2004, pp. 3935-43.
- [73] M.R. Larsen, T.E. Thingholm, O.N. Jensen, P. Roepstorff, and T.J.D. Jørgensen, “Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns.,” *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 4, Jul. 2005, pp. 873-86.
- [74] S. Zanivan, F. Gnad, S. a Wickström, T. Geiger, B. Macek, J. Cox, R. Fässler, and M. Mann, “Solid tumor proteome and phosphoproteome analysis by high resolution mass spectrometry.,” *Journal of proteome research*, vol. 7, Dec. 2008, pp. 5314-26.
- [75] J. Villén, S. a Beausoleil, S. a Gerber, and S.P. Gygi, “Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, Jan. 2007, pp. 1488-93.
- [76] S.A. Beausoleil, M. Jedrychowski, D. Schwartz, J.E. Elias, J. Villén, J. Li, M.A. Cohn, L.C. Cantley, and S.P. Gygi, “Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, Aug. 2004, pp. 12130-5.
- [77] K. Rikova, A. Guo, Q. Zeng, A. Possemato, J. Yu, H. Haack, J. Nardone, K. Lee, C. Reeves, Y. Li, Y. Hu, Z. Tan, M. Stokes, L. Sullivan, J. Mitchell, R. Wetzell, J. Macneill, J.M. Ren, J. Yuan, C.E. Bakalarski, J. Villen, J.M. Kornhauser, B. Smith, D. Li, X. Zhou, S.P. Gygi, T.-L. Gu, R.D. Polakiewicz, J. Rush, and M.J. Comb, “Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer.,” *Cell*, vol. 131, Dec. 2007, pp. 1190-203.
- [78] H. Voshol, M. Ehrat, J. Traenkle, E. Bertrand, and J. van Oostrum, “Antibody-based proteomics: analysis of signaling networks using reverse protein arrays.,” *The FEBS journal*, vol. 276, Dec. 2009, pp. 6871-9.
- [79] M. Inagaki, M. Watanabe, and H. Hidaka, “N-(2-Aminoethyl)-5-isoquinolinesulfonamide, a newly synthesized protein kinase inhibitor, functions as a ligand in affinity chromatography. Purification of Ca<sup>2+</sup>-activated, phospholipid-dependent and other protein kinases.,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 260, Mar. 1985, pp. 2922-5.
- [80] M. Knockaert, N. Gray, E. Damiens, Y.T. Chang, P. Grellier, K. Grant, D. Fergusson, J. Mottram, M. Soete, J.F. Dubremetz, K. Le Roch, C. Doerig, P. Schultz, and L. Meijer, “Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors.,” *Chemistry & biology*, vol. 7, Jun. 2000, pp. 411-22.

- [81] D. Brehmer, K. Godl, B. Zech, J. Wissing, and H. Daub, "Proteome-wide identification of cellular targets affected by bisindolylmaleimide-type protein kinase C inhibitors.," *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 3, May. 2004, pp. 490-500.
- [82] H. Daub, J.V. Olsen, M. Bairlein, F. Gnad, F.S. Oppermann, R. Körner, Z. Greff, G. Kéri, O. Stemmann, and M. Mann, "Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle.," *Molecular cell*, vol. 31, Aug. 2008, pp. 438-48.
- [83] T. Reinl, M. Nimtz, C. Hundertmark, T. Johl, G. Kéri, J. Wehland, H. Daub, and L. Jänsch, "Quantitative phosphokinome analysis of the Met pathway activated by the invasin internalin B from *Listeria monocytogenes*.," *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 8, Dec. 2009, pp. 2778-95.
- [84] J. Wissing, L. Jänsch, M. Nimtz, G. Dieterich, R. Hornberger, G. Kéri, J. Wehland, and H. Daub, "Proteomics analysis of protein kinases by target class-selective prefractionation and tandem mass spectrometry.," *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 6, Mar. 2007, pp. 537-47.
- [85] T. Reinl, "Phosphoproteom-Analysen humaner Kinasen: Charakterisierung des c-Met-Signalweges nach Aktivierung durch InlB von *Listeria monocytogenes*," 2008.
- [86] M.E.M. Noble, J. a Endicott, and L.N. Johnson, "Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 303, Mar. 2004, pp. 1800-5.
- [87] S. Blencke, B. Zech, O. Engkvist, Z. Greff, L. Orfi, Z. Horváth, G. Kéri, A. Ullrich, and H. Daub, "Characterization of a conserved structural determinant controlling protein kinase sensitivity to selective inhibitors.," *Chemistry & biology*, vol. 11, May. 2004, pp. 691-701.
- [88] S. Maass, S. Sievers, D. Zühlke, J. Kuzinski, P.K. Sappa, J. Muntel, B. Hessling, J. Bernhardt, R. Sietmann, U. Völker, M. Hecker, and D. Becher, "Efficient, global-scale quantification of absolute protein amounts by integration of targeted mass spectrometry and two-dimensional gel-based proteomics.," *Analytical chemistry*, vol. 83, Apr. 2011, pp. 2677-84.
- [89] S.P. Gygi, B. Rist, S.A. Gerber, F. Turecek, M.H. Gelb, and R. Aebersold, "Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags.," *Nature biotechnology*, vol. 17, Oct. 1999, pp. 994-9.
- [90] S.-E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D.B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, and M. Mann, "Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics.," *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 1, May. 2002, pp. 376-86.
- [91] S.-E. Ong and M. Mann, "A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC).," *Nature protocols*, vol. 1, Jan. 2006, pp. 2650-60.
- [92] P.L. Ross, Y.N. Huang, J.N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, S. Martin, M. Bartlet-Jones, F. He, A. Jacobson, and D.J. Pappin, "Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents.," *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 3, Dec. 2004, pp. 1154-69.
- [93] M. Grønberg, T.Z. Kristiansen, A. Iwahori, R. Chang, R. Reddy, N. Sato, H. Molina, O.N. Jensen, R.H. Hruban, M.G. Goggins, A. Maitra, and A. Pandey, "Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach.," *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 5, Jan. 2006, pp. 157-71.
- [94] P.A. Everley, J. Krijgsveld, B.R. Zetter, and S.P. Gygi, "Quantitative cancer proteomics: stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) as a tool for prostate cancer research.," *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 3, Jul. 2004, pp. 729-35.

- [95] X. Liang, J. Zhao, M. Hajivandi, R. Wu, J. Tao, J.W. Amshey, and R.M. Pope, "Quantification of membrane and membrane-bound proteins in normal and malignant breast cancer cells isolated from the same patient with primary breast carcinoma.," *Journal of proteome research*, vol. 5, Oct. 2006, pp. 2632-41.
- [96] U.-B. Kang, Y. Ahn, J.W. Lee, Y.-H. Kim, J. Kim, M.-H. Yu, D.-Y. Noh, and C. Lee, "Differential profiling of breast cancer plasma proteome by isotope-coded affinity tagging method reveals biotinidase as a breast cancer biomarker.," *BMC cancer*, vol. 10, Jan. 2010, p. 114.
- [97] R. Chen, S. Pan, E.C. Yi, S. Donohoe, M.P. Bronner, J.D. Potter, D.R. Goodlett, R. Aebersold, and T.A. Brentnall, "Quantitative proteomic profiling of pancreatic cancer juice.," *Proteomics*, vol. 6, Jul. 2006, pp. 3871-9.
- [98] A. Glen, C.S. Gan, F.C. Hamdy, C.L. Eaton, S.S. Cross, J.W.F. Catto, P.C. Wright, and I. Rehman, "iTRAQ-facilitated proteomic analysis of human prostate cancer cells identifies proteins associated with progression.," *Journal of proteome research*, vol. 7, Mar. 2008, pp. 897-907.
- [99] K.W.M. Siu, L.V. DeSouza, A. Scorilas, A.D. Romaschin, R.J. Honey, R. Stewart, K. Pace, Y. Youssef, T.-fung F. Chow, and G.M. Yousef, "Differential protein expressions in renal cell carcinoma: new biomarker discovery by mass spectrometry.," *Journal of proteome research*, vol. 8, Aug. 2009, pp. 3797-807.
- [100] S.N. Voisin, O. Krakovska, A. Matta, L.V. DeSouza, A.D. Romaschin, T.J. Colgan, and K.W.M. Siu, "Identification of novel molecular targets for endometrial cancer using a drill-down LC-MS/MS approach with iTRAQ.," *PloS one*, vol. 6, Jan. 2011, p. e16352.
- [101] Z. Xiao, G. Li, Y. Chen, M. Li, F. Peng, C. Li, F. Li, Y. Yu, Y. Ouyang, Z. Xiao, and Z. Chen, "Quantitative proteomic analysis of formalin-fixed and paraffin-embedded nasopharyngeal carcinoma using iTRAQ labeling, two-dimensional liquid chromatography, and tandem mass spectrometry.," *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, vol. 58, Jun. 2010, pp. 517-27.
- [102] P. Ivanyi, T. Winkler, A. Ganser, C. Reuter, and V. Grünwald, "Novel therapies in advanced renal cell carcinoma: management of adverse events from sorafenib and sunitinib.," *Deutsches Ärzteblatt international*, vol. 105, Mar. 2008, pp. 232-7.
- [103] L. Bastien, S. Culine, B. Paule, S. Ledbai, J.J. Patard, and A. de la Taille, "Targeted therapies in metastatic renal cancer in 2009.," *BJU international*, vol. 103, May. 2009, pp. 1334-42.
- [104] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk, "Measurement of protein using bicinchoninic acid.," *Analytical biochemistry*, vol. 150, Oct. 1985, pp. 76-85.
- [105] U.K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, 1970, p. 680-685.
- [106] G. Candiano, M. Bruschi, L. Musante, L. Santucci, G.M. Ghiggeri, B. Carnemolla, P. Orecchia, L. Zardi, and P.G. Righetti, "Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis.," *Electrophoresis*, vol. 25, May. 2004, pp. 1327-33.
- [107] D. Wessel and U.I. Flügge, "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids.," *Analytical biochemistry*, vol. 138, Apr. 1984, pp. 141-3.
- [108] C. Hundertmark, R. Fischer, T. Reinl, S. May, F. Klawonn, and L. Jansch, "MS-specific noise model reveals the potential of iTRAQ in quantitative proteomics.," *Bioinformatics (Oxford, England)*, vol. 25, Apr. 2009, pp. 1004-11.

- [109] M.B. Eisen, P.T. Spellman, P.O. Brown, and D. Botstein, "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, Dec. 1998, pp. 14863-8.
- [110] S. König, "Molekulare Mechanismen der Immunzell-Aktivierung : Quantitative Phosphoproteom-Studie der Kinase-basierten Signaltransduktion in T- und NK-Zellen," 2010.
- [111] H. Daub, "Characterisation of kinase-selective inhibitors by chemical proteomics.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1754, Dec. 2005, pp. 183-90.
- [112] Z. Zhang, L. Zhang, Y. Hua, X. Jia, J. Li, S. Hu, X. Peng, P. Yang, M. Sun, F. Ma, and Z. Cai, "Comparative proteomic analysis of plasma membrane proteins between human osteosarcoma and normal osteoblastic cell lines.," *BMC cancer*, vol. 10, Jan. 2010, p. 206.
- [113] L. Zhao, B.Y. Lee, D. a Brown, M.P. Molloy, G.M. Marx, N. Pavlakis, M.J. Boyer, M.R. Stockler, W. Kaplan, S.N. Breit, R.L. Sutherland, S.M. Henshall, and L.G. Horvath, "Identification of candidate biomarkers of therapeutic response to docetaxel by proteomic profiling.," *Cancer research*, vol. 69, Oct. 2009, pp. 7696-703.
- [114] L. Campbell, R. Nuttall, D. Griffiths, and M. Gumbleton, "Activated extracellular signal-regulated kinase is an independent prognostic factor in clinically confined renal cell carcinoma.," *Cancer*, vol. 115, Aug. 2009, pp. 3457-67.
- [115] T.M. Thornton, G. Pedraza-Alva, B. Deng, C.D. Wood, A. Aronshtam, J.L. Clements, G. Sabio, R.J. Davis, D.E. Matthews, B. Doble, and M. Rincon, "Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 320, May. 2008, pp. 667-70.
- [116] D.A. Cross, D.R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, and B.A. Hemmings, "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B.," *Nature*, vol. 378, 1995, pp. 785-9.
- [117] M. Meyerson, G.H. Enders, C.L. Wu, L.K. Su, C. Gorka, C. Nelson, E. Harlow, and L.H. Tsai, "A family of human cdc2-related protein kinases.," *The EMBO journal*, vol. 11, Aug. 1992, pp. 2909-17.
- [118] R.J. Brushia and D.A. Walsh, "Phosphorylase kinase: the complexity of its regulation is reflected in the complexity of its structure.," *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, vol. 4, Sep. 1999, pp. D618-41.
- [119] K. Niefind, B. Guerra, I. Ermakowa, and O.G. Issinger, "Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme.," *The EMBO journal*, vol. 20, Oct. 2001, pp. 5320-31.
- [120] K. Niefind, B. Guerra, I. Ermakowa, and O.G. Issinger, "Crystallization and preliminary characterization of crystals of human protein kinase CK2.," *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, vol. 56, Dec. 2000, pp. 1680-4.
- [121] E. Grasselli, V. Tomati, M.V. Bernasconi, C. Nicolini, and L. Vergani, "C-terminal region of protein kinase CK2 alpha: How the structure can affect function and stability of the catalytic subunit.," *Journal of cellular biochemistry*, vol. 92, May. 2004, pp. 270-84.
- [122] J. Tapia, G. Jacob, C.C. Allende, and J.E. Allende, "Role of the carboxyl terminus on the catalytic activity of protein kinase CK2alpha subunit.," *FEBS letters*, vol. 531, Nov. 2002, pp. 363-8.
- [123] I. Ermakova, B. Boldyreff, O.-G. Issinger, and K. Niefind, "Crystal structure of a C-terminal deletion mutant of human protein kinase CK2 catalytic subunit.," *Journal of molecular biology*, vol. 330, Jul. 2003, pp. 925-34.

- [124] M.V. Yusenko, R.P. Kuiper, T. Boethe, B. Ljungberg, A.G. van Kessel, and G. Kovacs, "High-resolution DNA copy number and gene expression analyses distinguish chromophobe renal cell carcinomas and renal oncocytomas," *BMC cancer*, vol. 9, Jan. 2009, p. 152.
- [125] J.P.T. Higgins, R. Shinghal, H. Gill, J.H. Reese, M. Terris, R.J. Cohen, M. Fero, J.R. Pollack, M. van de Rijn, and J.D. Brooks, "Gene expression patterns in renal cell carcinoma assessed by complementary DNA microarray," *The American journal of pathology*, vol. 162, Mar. 2003, pp. 925-32.
- [126] J.P.T. Higgins, "Gene array studies in renal neoplasia," *TheScientificWorldJournal*, vol. 6, Jan. 2006, pp. 502-11.
- [127] R. Beroukhim, J.-P. Brunet, A. Di Napoli, K.D. Mertz, A. Seeley, M.M. Pires, D. Linhart, R. a Worrell, H. Moch, M. a Rubin, W.R. Sellers, M. Meyerson, W.M. Linehan, W.G. Kaelin, and S. Signoretti, "Patterns of gene expression and copy-number alterations in von-hippel lindau disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney," *Cancer research*, vol. 69, Jun. 2009, pp. 4674-81.
- [128] K.M. Skubitz and A.P.N. Skubitz, "Differential gene expression in renal-cell cancer," *The Journal of laboratory and clinical medicine*, vol. 140, Jul. 2002, pp. 52-64.
- [129] B. Perroud, T. Ishimaru, A.D. Borowsky, and R.H. Weiss, "Grade-dependent proteomics characterization of kidney cancer," *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 8, May. 2009, pp. 971-85.
- [130] R. Lichtenfels, S.P. Dressler, M. Zobawa, C.V. Recktenwald, A. Ackermann, D. Atkins, M. Kersten, A. Hesse, M. Puttkammer, F. Lottspeich, and B. Seliger, "Systematic comparative protein expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: a pilot study based on the separation of tissue specimens by two-dimensional gel electrophoresis," *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 8, Dec. 2009, pp. 2827-42.
- [131] C. Sarto, A. Marocchi, J.C. Sanchez, D. Giannone, S. Frutiger, O. Golaz, M.R. Wilkins, G. Doro, F. Cappellano, G. Hughes, D.F. Hochstrasser, and P. Mocarelli, "Renal cell carcinoma and normal kidney protein expression," *Electrophoresis*, vol. 18, 1997, pp. 599-604.
- [132] B. Perroud, J. Lee, N. Valkova, A. Dhirapong, P.-Y. Lin, O. Fiehn, D. Kültz, and R.H. Weiss, "Pathway analysis of kidney cancer using proteomics and metabolic profiling," *Molecular cancer*, vol. 5, Jan. 2006, p. 64.
- [133] B. Seliger, S.P. Dressler, E. Wang, R. Kellner, C.V. Recktenwald, F. Lottspeich, F.M. Marincola, M. Baumgärtner, D. Atkins, and R. Lichtenfels, "Combined analysis of transcriptome and proteome data as a tool for the identification of candidate biomarkers in renal cell carcinoma," *Proteomics*, vol. 9, Mar. 2009, pp. 1567-81.
- [134] F.S. Oppermann, F. Gnad, J.V. Olsen, R. Hornberger, Z. Greff, G. Kéri, M. Mann, and H. Daub, "Large-scale proteomics analysis of the human kinome," *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 8, Jul. 2009, pp. 1751-64.
- [135] D.L. Gibbons, S. Pricl, H. Kantarjian, J. Cortes, and A. Quintás-Cardama, "The rise and fall of gatekeeper mutations? The BCR-ABL1 T315I paradigm," *Cancer*, Jul. 2011, pp. 1-7.
- [136] E. Tamborini, L. Bonadiman, A. Greco, V. Albertini, T. Negri, A. Gronchi, R. Bertulli, M. Colecchia, P.G. Casali, M.A. Pierotti, and S. Pilotti, "A new mutation in the KIT ATP pocket causes acquired resistance to imatinib in a gastrointestinal stromal tumor patient," *Gastroenterology*, vol. 127, Jul. 2004, pp. 294-9.
- [137] J.H. Trembley, G. Wang, G. Unger, J. Slaton, and K. Ahmed, "Protein kinase CK2 in health and disease: CK2: a key player in cancer biology," *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, vol. 66, Jun. 2009, pp. 1858-67.

- [138] J.M. Boer, W.K. Huber, H. Sülthmann, F. Wilmer, A. von Heydebreck, S. Haas, B. Korn, B. Gunawan, A. Vente, L. Füzesi, M. Vingron, and A. Poustka, "Identification and classification of differentially expressed genes in renal cell carcinoma by expression profiling on a global human 31,500-element cDNA array.," *Genome research*, vol. 11, Nov. 2001, pp. 1861-70.
- [139] A.N. Young, M.B. Amin, C.S. Moreno, S.D. Lim, C. Cohen, J.A. Petros, F.F. Marshall, and A.S. Neish, "Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers.," *The American journal of pathology*, vol. 158, May. 2001, pp. 1639-51.
- [140] E. Hirota, L. Yan, T. Tsunoda, S. Ashida, M. Fujime, T. Shuin, T. Miki, Y. Nakamura, and T. Katagiri, "Genome-wide gene expression profiles of clear cell renal cell carcinoma: identification of molecular targets for treatment of renal cell carcinoma.," *International journal of oncology*, vol. 29, Oct. 2006, pp. 799-827.
- [141] V.A. Valera, E. Li-Ning-T, B.A. Walter, D.D. Roberts, W.M. Linehan, and M.J. Merino, "Protein expression profiling in the spectrum of renal cell carcinomas.," *Journal of Cancer*, vol. 1, Jan. 2010, pp. 184-96.
- [142] T. Matysiak-Budnik and F. Mégraud, "Helicobacter pylori infection and gastric cancer.," *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, vol. 42, Apr. 2006, pp. 708-16.
- [143] K. Yamazaki, M. Sakamoto, T. Ohta, Y. Kanai, M. Ohki, and S. Hirohashi, "Overexpression of KIT in chromophobe renal cell carcinoma.," *Oncogene*, vol. 22, Feb. 2003, pp. 847-52.
- [144] E.A. Ahmed and M.E. Youssif, "Immunohistochemical study of c-KIT (CD117) expression in renal cell carcinoma.," *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, vol. 21, Jun. 2009, pp. 121-32.
- [145] A. Petit, M. Castillo, M. Santos, B. Mellado, J.B. Alcover, and C. Mallofré, "KIT expression in chromophobe renal cell carcinoma: comparative immunohistochemical analysis of KIT expression in different renal cell neoplasms.," *The American journal of surgical pathology*, vol. 28, May. 2004, pp. 676-8.
- [146] F. Moschella, R.P. Catanzaro, B. Bisikirska, I.S. Sawczuk, K.P. Papadopoulos, A.W. Ferrante, J.M. McKiernan, C.S. Hesdorffer, P.E. Harris, and A. Maffei, "Shifting gene expression profiles during ex vivo culture of renal tumor cells: implications for cancer immunotherapy.," *Oncology research*, vol. 14, Jan. 2003, pp. 133-45.
- [147] M.E. Lenburg, L.S. Liou, N.P. Gerry, G.M. Frampton, H.T. Cohen, and M.F. Christman, "Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data.," *BMC cancer*, vol. 3, Nov. 2003, p. 31.
- [148] L. Schips, R. Zigeuner, M. Ratschek, P. Rehak, J. Rüschoff, and C. Langner, "Analysis of insulin-like growth factors and insulin-like growth factor I receptor expression in renal cell carcinoma.," *American journal of clinical pathology*, vol. 122, Dec. 2004, pp. 931-7.
- [149] M.J. Soares, M. Pinto, R. Henrique, J. Vieira, N. Cerveira, A. Peixoto, A.T. Martins, J. Oliveira, C. Jerónimo, and M.R. Teixeira, "CSF1R copy number changes, point mutations, and RNA and protein overexpression in renal cell carcinomas.," *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, vol. 22, Jun. 2009, pp. 744-52.
- [150] J. Bain, L. Plater, M. Elliott, N. Shpiro, C.J. Hastie, H. McLauchlan, I. Klevernic, J.S.C. Arthur, D.R. Alessi, and P. Cohen, "The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update.," *The Biochemical journal*, vol. 408, Dec. 2007, pp. 297-315.
- [151] M.W. Karaman, S. Herrgard, D.K. Treiber, P. Gallant, C.E. Atteridge, B.T. Campbell, K.W. Chan, P. Ciceri, M.I. Davis, P.T. Edeen, R. Faraoni, M. Floyd, J.P. Hunt, D.J. Lockhart, Z.V. Milanov, M.J. Morrison, G. Pallares, H.K. Patel, S. Pritchard, L.M. Wodicka, and P.P.

- Zarrinkar, "A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity.," *Nature biotechnology*, vol. 26, Jan. 2008, pp. 127-32.
- [152] H. Daub, K. Godl, D. Brehmer, B. Klebl, and G. Müller, "Evaluation of kinase inhibitor selectivity by chemical proteomics.," *Assay and drug development technologies*, vol. 2, Apr. 2004, pp. 215-24.
- [153] M. Bantscheff, D. Eberhard, Y. Abraham, S. Bastuck, M. Boesche, S. Hobson, T. Mathieson, J. Perrin, M. Raida, C. Rau, V. Reader, G. Sweetman, A. Bauer, T. Bouwmeester, C. Hopf, U. Kruse, G. Neubauer, N. Ramsden, J. Rick, B. Kuster, and G. Drewes, "Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors.," *Nature biotechnology*, vol. 25, Sep. 2007, pp. 1035-44.
- [154] S.M. Wilhelm, C. Carter, L. Tang, D. Wilkie, A. McNabola, H. Rong, C. Chen, X. Zhang, P. Vincent, M. McHugh, Y. Cao, J. Shujath, S. Gawlak, D. Eveleigh, B. Rowley, L. Liu, L. Adnane, M. Lynch, D. Auclair, I. Taylor, R. Gedrich, A. Voznesensky, B. Riedl, L.E. Post, G. Bollag, and P. a Trail, "BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis.," *Cancer research*, vol. 64, Oct. 2004, pp. 7099-109.
- [155] X. Liu, F. Zhu, X. Ma, L. Tao, J. Zhang, S. Yang, Y. Wei, and Y.Z. Chen, "The Therapeutic Target Database: an Internet resource for the primary targets of approved, clinical trial and experimental drugs.," *Expert opinion on therapeutic targets*, vol. 15, Aug. 2011, pp. 903-12.
- [156] F. Zhu, B. Han, P. Kumar, X. Liu, X. Ma, X. Wei, L. Huang, Y. Guo, L. Han, C. Zheng, and Y. Chen, "Update of TTD: Therapeutic Target Database.," *Nucleic acids research*, vol. 38, Jan. 2010, pp. D787-91.
- [157] M.S. Squires, R.E. Feltell, N.G. Wallis, E.J. Lewis, D.-M. Smith, D.M. Cross, J.F. Lyons, and N.T. Thompson, "Biological characterization of AT7519, a small-molecule inhibitor of cyclin-dependent kinases, in human tumor cell lines.," *Molecular cancer therapeutics*, vol. 8, Feb. 2009, pp. 324-32.
- [158] D. Mahadevan, R. Plummer, M.S. Squires, D. Rensvold, S. Kurtin, C. Pretzinger, T. Dragovich, J. Adams, V. Lock, D.M. Smith, D. Von Hoff, and H. Calvert, "A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of AT7519, a cyclin-dependent kinase inhibitor in patients with refractory solid tumors.," *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, Feb. 2011.
- [159] S. Lapenna and A. Giordano, "Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer.," *Nature reviews. Drug discovery*, vol. 8, Jul. 2009, pp. 547-66.
- [160] K.S. Joshi, M.J. Rathos, R.D. Joshi, M. Sivakumar, M. Mascarenhas, S. Kamble, B. Lal, and S. Sharma, "In vitro antitumor properties of a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00.," *Molecular cancer therapeutics*, vol. 6, Mar. 2007, pp. 918-25.
- [161] B. Seliger, S.P. Dressler, R. Lichtenfels, and R. Kellner, "Candidate biomarkers in renal cell carcinoma.," *Proteomics*, vol. 7, Dec. 2007, pp. 4601-12.
- [162] B.D. Looyenga, K. a Furge, K.J. Dykema, J. Koeman, P.J. Swiatek, T.J. Giordano, A.B. West, J.H. Resau, B.T. Teh, and J.P. MacKeigan, "Chromosomal amplification of leucine-rich repeat kinase-2 (LRRK2) is required for oncogenic MET signaling in papillary renal and thyroid carcinomas.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, Jan. 2011, pp. 1439-44.
- [163] R. Weinberger, B. Appel, A. Stein, Y. Metz, A. Neheman, and M. Barak, "The pyruvate kinase isoenzyme M2 (Tu M2-PK) as a tumour marker for renal cell carcinoma.," *European journal of cancer care*, vol. 16, Jul. 2007, pp. 333-7.
- [164] D. Huang, Y. Ding, W.-M. Luo, S. Bender, C.-N. Qian, E. Kort, Z.-F. Zhang, K. VandenBeldt, N.S. Duesbery, J.H. Resau, and B.T. Teh, "Inhibition of MAPK kinase

- signaling pathways suppressed renal cell carcinoma growth and angiogenesis in vivo.,” *Cancer research*, vol. 68, Jan. 2008, pp. 81-8.
- [165] A. Giubellino, W.M. Linehan, and D.P. Bottaro, “Targeting the Met signaling pathway in renal cancer.,” *Expert review of anticancer therapy*, vol. 9, Jun. 2009, pp. 785-93.
- [166] J.S. Choi, M.-K. Kim, J.W. Seo, Y.-L. Choi, D.H. Kim, Y.K. Chun, and Y.H. Ko, “MET expression in sporadic renal cell carcinomas.,” *Journal of Korean medical science*, vol. 21, Aug. 2006, pp. 672-7.
- [167] J. Woodard, S. Joshi, B. Viollet, N. Hay, and L.C. Platanias, “AMPK as a therapeutic target in renal cell carcinoma,” *Cancer Biology & Therapy*, vol. 10, Dec. 2010, pp. 1168-1177.
- [168] C. Sourbier, V. Lindner, H. Lang, A. Agouni, E. Schordan, S. Danilin, S. Rothhut, D. Jacqmin, J.-J. Helwig, and T. Massfelder, “The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy.,” *Cancer research*, vol. 66, May. 2006, pp. 5130-42.
- [169] F.M. Uckun and S. Qazi, “Bruton’s tyrosine kinase as a molecular target in treatment of leukemias and lymphomas as well as inflammatory disorders and autoimmunity.,” *Expert opinion on therapeutic patents*, vol. 20, Nov. 2010, pp. 1457-70.
- [170] B.V. McConnell, K. Koto, and A. Gutierrez-Hartmann, “Nuclear and cytoplasmic LIMK1 enhances human breast cancer progression.,” *Molecular cancer*, vol. 10, Jan. 2011, p. 75.
- [171] S.J. Kim, S. Nakayama, Y. Miyoshi, T. Taguchi, Y. Tamaki, T. Matsushima, Y. Torikoshi, S. Tanaka, T. Yoshida, H. Ishihara, and S. Noguchi, “Determination of the specific activity of CDK1 and CDK2 as a novel prognostic indicator for early breast cancer.,” *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, vol. 19, Jan. 2008, pp. 68-72.
- [172] S.-J. Chen, T. Nakahara, M. Takahara, M. Kido, L. Dugu, H. Uchi, S. Takeuchi, Y.-T. Tu, Y. Moroi, and M. Furue, “Activation of the mammalian target of rapamycin signalling pathway in epidermal tumours and its correlation with cyclin-dependent kinase 2.,” *The British journal of dermatology*, vol. 160, Feb. 2009, pp. 442-5.
- [173] A. Deshpande, P. Sicinski, and P.W. Hinds, “Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective.,” *Oncogene*, vol. 24, Apr. 2005, pp. 2909-15.
- [174] J. Li, W. Zhu, T. Leng, M. Shu, Y. Huang, D. Xu, P. Qiu, X. Su, and G. Yan, “Triptolide-induced cell cycle arrest and apoptosis in human renal cell carcinoma cells.,” *Oncology reports*, vol. 25, Apr. 2011, pp. 979-87.
- [175] D.L. Guo, J. Zhang, S.T. Yuen, W.Y. Tsui, A.S.Y. Chan, C. Ho, J. Ji, S.Y. Leung, and X. Chen, “Reduced expression of EphB2 that parallels invasion and metastasis in colorectal tumours.,” *Carcinogenesis*, vol. 27, Mar. 2006, pp. 454-64.
- [176] E. Batlle, J. Bacani, H. Begthel, S. Jonkheer, S. Jonkeer, A. Gregorieff, M. van de Born, N. Malats, E. Sancho, E. Boon, T. Pawson, S. Gallinger, S. Pals, and H. Clevers, “EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression.,” *Nature*, vol. 435, Jun. 2005, pp. 1126-30.
- [177] K.H. Yoo, Y.-K. Park, H.-S. Kim, W.-W. Jung, and S.-G. Chang, “Identification of MAPK10 as a novel epigenetic marker for chromophobe kidney cancer.,” *Pathology international*, vol. 61, Jan. 2011, pp. 52-4.
- [178] D.D. Yang, C.Y. Kuan, a J. Whitmarsh, M. Rincón, T.S. Zheng, R.J. Davis, P. Rakic, and R. a Flavell, “Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene.,” *Nature*, vol. 389, Oct. 1997, pp. 865-70.
- [179] P. Huusko, D. Ponciano-Jackson, M. Wolf, J. a Kiefer, D.O. Azorsa, S. Tuzmen, D. Weaver, C. Robbins, T. Moses, M. Allinen, S. Hautaniemi, Y. Chen, A. Elkahoul, M.



- Basik, G.S. Bova, L. Bubendorf, A. Lugli, G. Sauter, J. Schleutker, H. Ozelik, S. Elowe, T. Pawson, J.M. Trent, J.D. Carpten, O.-P. Kallioniemi, and S. Mousses, "Nonsense-mediated decay microarray analysis identifies mutations of EPHB2 in human prostate cancer.," *Nature genetics*, vol. 36, Sep. 2004, pp. 979-83.
- [180] J. Ying, H. Li, Y. Cui, a H.Y. Wong, C. Langford, and Q. Tao, "Epigenetic disruption of two proapoptotic genes MAPK10/JNK3 and PTPN13/FAP-1 in multiple lymphomas and carcinomas through hypermethylation of a common bidirectional promoter.," *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*, vol. 20, Jun. 2006, pp. 1173-5.
- [181] I. Zemp, T. Wild, M.-F. O'Donohue, F. Wandrey, B. Widmann, P.-E. Gleizes, and U. Kutay, "Distinct cytoplasmic maturation steps of 40S ribosomal subunit precursors require hRio2.," *The Journal of cell biology*, vol. 185, Jun. 2009, pp. 1167-80.
- [182] J. Rouquette, V. Choesmel, and P.-E. Gleizes, "Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells.," *The EMBO journal*, vol. 24, Aug. 2005, pp. 2862-72.
- [183] E. Ohta, F. Kawakami, M. Kubo, and F. Obata, "LRRK2 directly phosphorylates Akt1 as a possible physiological substrate: Impairment of the kinase activity by Parkinson's disease-associated mutations.," *FEBS letters*, vol. 585, Jul. 2011, pp. 2165-70.
- [184] G.L. Semenza, "HIF-1 mediates the Warburg effect in clear cell renal carcinoma.," *Journal of bioenergetics and biomembranes*, vol. 39, Jun. 2007, pp. 231-4.
- [185] O. WARBURG, "On the origin of cancer cells.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 123, Feb. 1956, pp. 309-14.
- [186] P.P. Hsu and D.M. Sabatini, "Cancer cell metabolism: Warburg and beyond.," *Cell*, vol. 134, Sep. 2008, pp. 703-7.
- [187] Q. Sun, X. Chen, J. Ma, H. Peng, F. Wang, X. Zha, Y. Wang, Y. Jing, H. Yang, R. Chen, L. Chang, Y. Zhang, J. Goto, H. Onda, T. Chen, M.-R. Wang, Y. Lu, H. You, D. Kwiatkowski, and H. Zhang, "Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, Mar. 2011, pp. 4129-34.
- [188] H.R. Christofk, M.G. Vander Heiden, M.H. Harris, A. Ramanathan, R.E. Gerszten, R. Wei, M.D. Fleming, S.L. Schreiber, and L.C. Cantley, "The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth.," *Nature*, vol. 452, Mar. 2008, pp. 230-3.
- [189] C.-W. Lu, S.-C. Lin, K.-F. Chen, Y.-Y. Lai, and S.-J. Tsai, "Induction of pyruvate dehydrogenase kinase-3 by hypoxia-inducible factor-1 promotes metabolic switch and drug resistance.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, Oct. 2008, pp. 28106-14.
- [190] R. Gudi, M.M. Bowker-Kinley, N.Y. Kedishvili, Y. Zhao, and K.M. Popov, "Diversity of the pyruvate dehydrogenase kinase gene family in humans.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 270, Dec. 1995, pp. 28989-94.
- [191] N. Eto, M. Miyagishi, R. Inagi, T. Fujita, and M. Nangaku, "Mitogen-activated protein 3 kinase 6 mediates angiogenic and tumorigenic effects via vascular endothelial growth factor expression.," *The American journal of pathology*, vol. 174, Apr. 2009, pp. 1553-63.
- [192] B. Drogat, P. Auguste, D.T. Nguyen, M. Bouche-careilh, R. Pineau, J. Nalbantoglu, R.J. Kaufman, E. Chevet, A. Bikfalvi, and M. Moenner, "IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo.," *Cancer research*, vol. 67, Jul. 2007, pp. 6700-7.

- [193] A. Moritz, Y. Li, A. Guo, J. Villén, Y. Wang, J. MacNeill, J. Kornhauser, K. Sprott, J. Zhou, A. Possemato, J.M. Ren, P. Hornbeck, L.C. Cantley, S.P. Gygi, J. Rush, and M.J. Comb, "Akt-RSK-S6 kinase signaling networks activated by oncogenic receptor tyrosine kinases.," *Science signaling*, vol. 3, Jan. 2010, p. ra64.
- [194] C.M. Wells, A. Abo, and A.J. Ridley, "PAK4 is activated via PI3K in HGF-stimulated epithelial cells.," *Journal of cell science*, vol. 115, Oct. 2002, pp. 3947-56.
- [195] C. Dan, A. Kelly, O. Bernard, and A. Minden, "Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, Aug. 2001, pp. 32115-21.
- [196] T. Ahmed, K. Shea, J.R.W. Masters, G.E. Jones, and C.M. Wells, "A PAK4-LIMK1 pathway drives prostate cancer cell migration downstream of HGF.," *Cellular signalling*, vol. 20, Jul. 2008, pp. 1320-8.
- [197] J.H. Wright, X. Wang, G. Manning, B.J. LaMere, P. Le, S. Zhu, D. Khatry, P.M. Flanagan, S.D. Buckley, D.B. Whyte, A.R. Howlett, J.R. Bischoff, K.E. Lipson, and B. Jallal, "The STE20 kinase HGK is broadly expressed in human tumor cells and can modulate cellular transformation, invasion, and adhesion.," *Molecular and cellular biology*, vol. 23, Mar. 2003, pp. 2068-82.
- [198] H.-J. Zhang, M.K.Y. Siu, M.C.W. Yeung, L.-L. Jiang, V.C.Y. Mak, H.Y.S. Ngan, O.G.W. Wong, H.-Q. Zhang, and A.N.Y. Cheung, "Overexpressed PAK4 promotes proliferation, migration and invasion of choriocarcinoma.," *Carcinogenesis*, vol. 32, May. 2011, pp. 765-71.
- [199] D.H. Vlecken and C.P. Bagowski, "LIMK1 and LIMK2 are important for metastatic behavior and tumor cell-induced angiogenesis of pancreatic cancer cells," *Zebrafish*, vol. 6, Dec. 2009, p. 433-439.
- [200] B.I. Rini, S.C. Campbell, and B. Escudier, "Renal cell carcinoma.," *Lancet*, vol. 373, Mar. 2009, pp. 1119-32.
- [201] Y. Shiio and R. Aebersold, "Quantitative proteome analysis using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry.," *Nature protocols*, vol. 1, Jan. 2006, pp. 139-45.
- [202] S.J. Wall, E. Werner, Z. Werb, and Y. a DeClerck, "Discoidin domain receptor 2 mediates tumor cell cycle arrest induced by fibrillar collagen.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, Dec. 2005, pp. 40187-94.

## **DANKSAGUNG**

Abschließend möchte ich noch gern ein paar persönliche Worte des Dankes sagen.

Herrn Prof. Lothar Jänsch danke ich herzlich für das sehr interessante Thema und die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe ‚Zelluläre Proteomforschung‘. Seine fachliche Unterstützung, sowie seine Diskussionsbereitschaft weiß ich sehr zu schätzen.

Herrn Prof. Michael Steinert danke ich sehr für die Übernahme des Zweitgutachters und Herrn Prof. Korte danke ich, dass er den Vorsitz der Prüfungskommission übernommen hat.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kooperationspartnern, Herrn Prof. Hammerer und Frau Kathrin Haberecht, der Klinik für Urologie und Uroonkologie am Klinikum Braunschweig. Ohne sie wäre dieses Projekt nicht so möglich gewesen. Für mich als Biologin beinhaltete diese Kooperation was ganz Besonderes. Ich durfte persönlich mit in den Operationssaal, wodurch ich einen ganz anderen Blick auf meine eigene Thematik bekommen habe. Es war nicht nur Laborarbeit und Grundlagenforschung, sondern es verbargen sich menschliche Schicksale hinter den Proben mit denen ich arbeiten durfte. In diesem Zusammenhang möchte ich allen Patienten danken, die ihre Einwilligung gegeben haben.

Als nächstes möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Kollegen der Arbeitsgruppe ‚Zelluläre Proteomforschung‘ bedanken. Bei Herrn Josef Wissing bedanke ich mich für wertvolle Hilfestellungen, den vielen Tipps und Tricks zu meinen Laborarbeiten. Herrn Dr. Manfred Nimtz danke ich für die vielen Erklärungen bei kleinen und großen Problemen der massenspektrometrischen Auswertung. Herrn Dr. Uwe Kärst danke ich sehr für seine Unterstützung, seine Ratschläge und Lösungen bei dieser, aber auch vielen anderen Arbeiten. Herrn Prof. Frank Klawoon gilt mein Dank für die statistische Auswertung meiner Daten. Thorsten Johl und Christoph Gernert danke ich für die Unterstützung bei der einen oder anderen Hard- und Software-Frage unterschiedlichster Art. Kirsten Minkhart, Kathrin Goltz und Reiner Munder waren die fleißigen TAs im Hintergrund, die einem zudem bei Problemen und Zeitnöten gern geholfen haben. Für die vielen schönen Gespräche fachlicher aber auch privater Natur möchte ich mich bei Evelin Berger, Kirstin Jurrat, Zofia Magnowska, und „Professor“ Alexander Iphöfer bedanken. Schön, wenn man solche Kollegen und Freunde wie euch hat.

Herrn Dr. Tobias Reinl möchte ich ganz besonders danken. Er hat mich von Anfang an bei der Doktorarbeit unterstützt und ist mir in der ganzen Zeit ein sehr wichtiger Freund geworden.

Agnes Zimmer, Luisa Winkler, „den Bingos“ Katrin und Ulfert Rand, Annegret Wenk, Sabine Steinert, Luise Lehmann, Denise Reichel, Antje Richter, Cornelia Kiesch, Frauke Griese, Kathrin Förster, Judith Kuzinski, Viola Nähse; es ist schön zu wissen, dass man so tolle Freunde wie euch hat.

Für Stunden des Abschaltens, des Auspowerns aber vor allem für die Freude, die ich beim Unihockey hatte, möchte ich mich bei euch allen vom Sport bedanken.

Einen ganz lieben und dicken Dank schicke ich an die besten Eltern und den besten kleinen großen Bruder der Welt. Eure Unterstützung, die vielen aufmunternden Telefonate und die schönen Ostpakete haben mir Kraft gegeben, die ich für diese Arbeit brauchte.

Mein Christian. Danke, dass ich die deine und du die meine Liebe bist.